

Burden Hour Statement. This form is estimated to take 0.2 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Box Patent Application, Washington, DC 20231.

2025 RELEASE UNDER E.O. 14176

- 10

FEE TRANSMITTAL

for FY 2000

Patent fees are subject to annual revision.
Small Entity payments must be supported by a small entity statement,
otherwise large entity fees must be paid. See Forms PTO/SB/09-12
See 37 C.F.R. §§ 1.27 and 1.28.

TOTAL AMOUNT OF PAYMENT (\$980.00)

Complete if Known

Application Number	
Filing Date	October 4, 2000
First Named Inventor	Yoshitada OSHIDA, ET AL.
Examiner Name	
Group / Art Unit	
Attorney Docket No.	500.39147X00

METHOD OF PAYMENT (check one)

1. ☐ The Commissioner is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayments to:

Deposit Account Number 01-2135

Deposit Account Name Antonelli, Terry, Stout & Kraus

☒ Charge Any Additional Fee Required
Under 37 CFR §§ 1.16 and 1.17

2. ☒ Payment Enclosed:

☐ Check ☐ Money Order ☒ Other

FEE CALCULATION

1. BASIC FILING FEE

Large Entity Fee Code (\$)	Small Entity Fee Code (\$)	Fee Description	Fee Paid
101 690	201 345	Utility filing fee	710.00
106 310	206 155	Design filing fee	
107 480	207 240	Plant filing fee	
108 690	208 345	Reissue filing fee	
114 150	214 75	Provisional filing fee	

SUBTOTAL (1) (\$ 710.00)

2. EXTRA CLAIM FEES

Total Claims	Extra Claims	Fee from below	Fee Paid
35	-20** = 15	X 18	= 270
Independent Claims	- 3** =	X	= 0
Multiple Dependent			= 0

**or number previously paid, if greater; For Reissues, see below

Large Entity Fee Code (\$)	Small Entity Fee Code (\$)	Fee Description	Fee Paid
103 18	203 9	Claims in excess of 20	
102 78	202 39	Independent claims in excess of 3	
104 260	204 130	Multiple dependent claim, if not paid	
109 78	209 39	** Reissue independent claims over original patent	
110 18	210 9	** Reissue claims in excess of 20 and over original patent	

SUBTOTAL (2) (\$ 270.00)

FEE CALCULATION (continued)

3. ADDITIONAL FEES

Large Entity Fee Code (\$)	Small Entity Fee Code (\$)	Fee Description	Fee Paid
105 130	205 65	Surcharge - late filing fee or oath	0.00
127 50	227 25	Surcharge - late provisional filing fee or cover sheet	0.00
139 130	139 130	Non-English specification	0.00
147 2,520	147 2,520	For filing a request for reexamination	0.00
112 920*	112 920*	Requesting publication of SIR prior to Examiner action	0.00
113 1,840*	113 1,840*	Requesting publication of SIR after Examiner action	0.00
115 110	215 55	Extension for reply within first month	0.00
116 380	216 190	Extension for reply within second month	0.00
117 870	217 435	Extension for reply within third month	0.00
118 1,360	218 680	Extension for reply within fourth month	0.00
128 1,850	228 925	Extension for reply within fifth month	0.00
119 300	219 150	Notice of Appeal	0.00
120 300	220 150	Filing a brief in support of an appeal	0.00
121 260	221 130	Request for oral hearing	0.00
138 1,510	138 1,510	Petition to institute a public use proceeding	0.00
140 110	240 55	Petition to revive - unavoidable	0.00
141 1,210	241 605	Petition to revive - unintentional	0.00
142 1,210	242 605	Utility issue fee (or reissue)	0.00
143 430	243 215	Design issue fee	0.00
144 580	244 290	Plant issue fee	0.00
122 130	122 130	Petitions to the Commissioner	0.00
123 50	123 50	Petitions related to provisional applications	0.00
126 240	126 240	Submission of Information Disclosure Stmt	0.00
581 40	581 40	Recording each patent assignment per property (times number of properties)	0.00
146 690	246 345	Filing a submission after final rejection (37 CFR § 1.129(a))	0.00
149 690	249 345	For each additional invention to be examined (37 CFR § 1.129(b))	0.00
Other fee (specify)			0.00
Other fee (specify)			0.00

* Reduced by Basic Filing Fee Paid

SUBTOTAL (3) (\$ 0.00)

SUBMITTED BY

Name (Print/Type) Melvin Kraus
Signature [Signature]

Registration No. (Attorney/Agent) 22,466

Complete (if applicable)

Telephone 703-312-6600
Date 10/04/2000

WARNING:

Information on this form may become public. Credit card information should not be included on this form. Provide credit card information and authorization on PTO-2038.

Burden Hour Statement: This form is estimated to take 0.2 hours to complete. Time will vary depending upon the needs of the individual case. Any comments on the amount of time you are required to complete this form should be sent to the Chief Information Officer, Patent and Trademark Office, Washington, DC 20231. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Assistant Commissioner for Patents, Washington, DC 20231.

E5532-01EX

Title of the Invention

DNAチップの検査方法 及びその装置

"A method of inspecting a DNA chip
and an apparatus thereof"

Background of the Invention

~~10001)~~

~~〔発明の属する技術分野〕~~

本発明は、平面上の試料から発する発光（蛍光）パターンを読み取り解析する装置に関し、特に蛍光体で標識されたDNA又はRNA、オリゴヌクレオチドなどの生体試料を基板上の複数の位置に捕捉し、その蛍光標識物の発光パターンを^{方法及び}読み取る装置に関する。

（高分解能、高速、高感度で）

~~10002)~~

~~〔従来技術〕~~

DNA、蛋白質等の分析技術は、遺伝子解析や遺伝子診断を含む医学、生物学の分野で重要である。特に最近では、DNAプローブアレイ（又はオリゴチップ

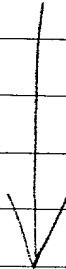
09678652 100400

、DNAチップ、バイオチップなど種々の名称で呼ばれるが、以下では、まとめてDNAプローブアレイとする)を使い、1つの検体から多種のDNA配列情報、遺伝子情報を同時に検査分析方法及び装置が注目されている。DNAプローブアレイは、ガラス等の基板を使用し、これを複数(数百~数千万個)の領域に分けて、各々に目的の(通常、種類の異なる)DNAプローブを固定化し、各々を微小な反応領域にしたものである。これと検体とを反応させることで、検体中の目的DNAが前記固定化されたDNAプローブとハイブリダイズして捕捉され、さらに蛍光プローブなどを結合させることで、結合状態(位置すなわちハイ

ブリダイズした配列)とその量を蛍光強度等で測定する事が可能になり、遺伝子診断、シーケンス等に利用することができる。

~~{0003}~~

このDNAプローブアレイの各反応領域に捕捉された目的DNAの蛍光標識から発せられる蛍光強度の読み取りには、通常スキャナーと呼ばれる顕微鏡(共焦点蛍光顕微鏡)様の装置が使用される(例えば、特開平11-315095号公報参照)。この装置は、アレイ上にレーザ光などの励起光を1個の微小スポットにして照射し、生じる蛍光を干渉フィルタなどの分光素子を使って励起光と分離し、蛍光強度を光電子増倍管などの光検出器にて検出する。その際、ガルバノミラーなどを使って励起光を振って、アレイ上に形成される微小スポットを2次元的に走査したり、又は、微小スポットの位置を固定し、アレイを2次元的に走査したりすることで、アレイ全体の蛍光強度分布、つまりは各DNAプローブに対する結合の度合を知ることができる。



ファイル名 = D99007021A1.e1

~~させることにより、チップ上の所望の場所を順次検出する方法により行っていた~~

~~{0003}~~

~~{発明が解決しようとする課題}~~

DNAの検査を、従来の血液検査のような生体検査に適用しようとする、多数の生検体に対し、高速に行うことが不可欠になる。しかるに、従来の技術では、DNAチップの必要な検査分解能に対し、この分解能相当の励起光スポットを1点照射し、得られる蛍光を順次検出していると、検査時間が大幅にかかる。これは、この1点の検出当たりに必要な時間が無制限に短くできないことに関係している。即ち、励起光を照射したのち、蛍光が発生し終わるまでの時間 Δt_L がおおよそ10n秒程度かかるためである。蛍光が終わるのを待たず次に検出点に移ってしまうと検出できなくなる。

~~{0004}~~

また、上記の必要な検出分解能相当のスポット光サイズ中に、数個の蛍光分子があるような状態まで高感度に検出することが必要である。しかし、発生した蛍光が総て検出されるわけではない。即ち、検出光学系の光利用効率や光検出に用いられる光電子倍增管量子効率が、100%ではない。更に、励起光が蛍光物体で吸収される効率や、吸収された励起光が蛍光に変わる確率が小さい。このため、 Δt_L の少なくとも数十倍から数百倍の時間をかけて検出する必要があり、更にこの時間を長くするほど、フォトンカウントに近い微弱光に対する検出精度が高くなる。

~~{0005}~~

また、このような高速性を実用レベルで達成するには、DNAチップに混入する各種タンパク質からなる異物の影響を除去或いは低減したり、蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイゼーションした検査面に、検出系の焦点を常時合わせる必要がある。また、複数の蛍光に対して、高速に検査することが必要になる場合もある。

~~【0003】~~

~~【発明が解決しようとする課題】~~

レーザ光源から出射したビームからマルチスポット光を形成する際、出射した光を無駄なくマルチスポット光にしようとする、例えば1列状に0.4mmの

ピッチで配列した0.04mm径の50個のマルチスポット光を形成しようとする、出射したレーザビームを縦横比が1対50の長円状の形状になるよう成形する。この長円状のビームを0.4mmピッチで並ぶマイクロレンズアレイに照射すれば、このレンズの焦点距離が例えば60mmであれば、ほぼ0.04mm径のマルチスポット光が0.4mmピッチで50個得られる。レーザのビームの強度分布はガウス分布であるので、このような方法で形成されたマルチスポット光は50個配列したマルチスポット光の配列の中心付近は明るく、周辺は暗くなってしまふ。この中心と周辺のスポットの強度をできるだけ等しくしようとする、マイクロレンズ50個の幅に比べ入射する長円状のビームの広がりをも十分に大きくしなければならない。その結果レーザ光源より出射したレーザビームエネルギーの半分以上が無駄になってしまう。

~~【0004】~~

~~【発明が解決しようとする課題】~~

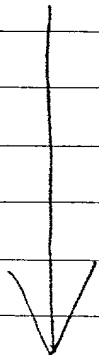
DNAプローブアレイでは固定化するプローブの種類が増大し、高密度化が進んでいる。そのため、DNAプローブアレイの蛍光標識物の分布計測装置には、高分解能に加え、高速化・高感度化が望まれる。しかし、上記の装置では、この点について十分に考慮されていない。つまり、高分解能化するには励起光のスポット径をより微小にする必要があるが、その場合（スポット当たりの露光時間が同じ場合）走査時間が増大する。さらに、スポット径が小さくなるためその内部

に存在する蛍光分子数が少なくなり、検出感度も低下する。また、高速化するには走査速度を増大させたり、励起光のスポット径を大きくする必要があるが、走査速度を増大すると蛍光体への励起時間が短くなることで蛍光強度が小さくなったり、また回路ノイズが増大し、検出感度が低下してしまう。また、高感度化するには、スポット径を大きく、走査速度を遅くする必要がある。つまり、高分解能、高速化、高感度化はそれぞれ相反しており、それらを実現するのが困難であった。

~~10005~~

また、試料面に複数の微小スポットを形成し、それら複数のスポットからの光を同時に検出する装置も提案されている（例えば、特開平11-118446号公報参照）。この構成では、励起光源の光束を拡げ、そこに2次元マイクロレンズアレイを配置して複数の照射スポットを形成し、これを試料面上に投影している。しかし、この場合、特に励起光にレーザー光を使用したとき、レーザー光のガウス分布特性により、中心部のスポットの光強度は強く、周辺に行くに従ってスポットの光強度は小さくなり、複数の照射スポットすべての光強度を均一にすることが困難である。2次元マイクロレンズアレイの幅に比べて十分に大きい径の光束に励起光を拡げれば、その問題は低減されるが、その場合光の利用効率が悪く光強度が小さくなり、検出感度を悪化させてしまうなどの課題がある。

本発明の目的は、上記の問題を解決し、高分解能、高速化を同時に達成することのできるDNAプロベアレイ等における蛍光標識物の分布計測装置を提供することである。



[0004]

【発明が解決しようとする課題】

~~上記の何れの方法も微弱な蛍光を2次元的に検出しようとするとき非常に長い時~~

~~間を要する。~~1ビームレーザ光を対象物に絞り込む方法は1絵素ずつ時系列的に検出するため、蛍光が非常に微弱な場合1絵素分の検出に時間を要し、2次元画像全体を検出するにはかなりの時間を要する。微弱な蛍光を発する対象を高速に検出するため、1ビームレーザの励起光を強くしても、例えば 6000×6000 絵素を1分で検出しようとするとき1絵素当たりの検出時間は $1 \sim 2 \mu\text{sec}$ (マイクロ秒)となる。このような短い時間で検出しようとするとき、蛍光検出強度を広いダイナミックレンジ (例えば 2^{16}) で検出することが困難になる。また通常の蛍光は励起光を受光してから $10^{-9} \sim 10^{-5} \text{sec}$ 遅延して蛍光を発するので、1絵素当たりの蛍光検出時間が1から $2 \mu\text{sec}$ では十分な蛍光検出ができない。他方ニッポウディスクを用いる方法は一様光中の微小開口の比率分しか光が有効に用いられないため、微弱蛍光を検出するのにかなりの時間を要する。

ファイル名 = D99007021A1.e1

~~10006~~ Summary of the Invention

【課題を解決するための手段】

上記の課題を解決するために、本発明では以下に示す様な手段を施している。

~~10007~~

各セルの寸法D以下のスポット径dからなり複数Mの励起光を互いに異なる位置に蛍光減衰時間以上の時間 Δt に亘り対物レンズを用いて同時に照射し、得られる蛍光を蛍光検出光路に導き、DNAチップの照射スポットと共役な関係にある結像面で検出し、蛍光の位置と強度から被検査DNAチップの検査を行う。

このとき上記スポット径は上記セル寸法の整数Nに対しほぼ $1/N$ にする。更に上記照射スポット位置とDNAチップの相対位置を順次j回に亘り異ならしめ全検査対象位置 $LN^2 = Mj$ を^(ここでLはチップ内のセル数である。)検査する。またNを2以上にしセルを複数の部分に分割し、1セル内にある N^2 個のデータの内有意なデータのみを選択し、処理することにより正確な検査を行う。このようにすることにより、DNAチップの全検査対象サンプル点数 LN^2 に対し、 $LN^2 / (6 \times 10^5)$ 秒以内の時間で蛍光検出する。

~~10008~~

上記DNAチップへの複数MのDNAチップへの照射スポットと共役な関係にある結像面で照射スポット像とほぼ同程度の有効径を有するM個の受光開口を有し、当該受光開口外は遮光し、当該受光開口を透過した各々の光を検出することにより、照射スポット或いは照射スポット面以外からの雑音光を除去し信号対雑音比の高い検査を行っている。また上記照射スポット像とほぼ同程度の有効径を有するM個の受光開口は光ファイバ受光端であり、該ファイバの出射端より出射する光を検出することにより更に信号対雑音比の大きな検出を行っている。

~~10009~~

上記DNAチップへの複数Mの照射スポットはスポット径d、整数kに対しほぼkdの間隔を持って直線上に配列し、このスポットアレイを上記 Δt 時間照射後、ほぼdだけアレイ方向に移動し、 Δt 時間照射する。この動作を順次k回繰り返すことにより、アレイ方向にkM個のスポット位置に亘り検査を行い、かつDNAチップと検査装置を少なくともアレイと直角方向に、相対的に移動するこ

ファイル名 = D99007021A1.e1

とによりDNAチップの所望の2次元領域を検査する。また上記スポットアレイの移動は音響光偏向器を用いて行うことを特徴とする。

また整数kは2以上であることが望ましく、さらにkは5以上であると信号耐対音比の上で更に有利である。

~~{0010}~~

上記スポットアレイはマイクロレンズアレイで形成する。また上記スポットアレイはホログラムで形成することもできる。上記スポットアレイのアレイ方向の移動と同期させ、励起光により生じた蛍光が上記受光開口上のほぼ同一箇所に来るように蛍光検出光路内に蛍光検出偏向手段を設ける。この際上記蛍光検出偏向手段は圧電素子を用いた偏向手段を用いる。また上記蛍光検出偏向手段は励起光を透過させ、蛍光を反射させる波長選択ビームスプリッタで構成させることにより効率よく検出できる。また励起光との分離を良くするため励起光路から分離された蛍光検出光路内に蛍光のみを透過し、励起光を遮光するフィルタを用いる。

~~{0011}~~

上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの瞳上でほぼ同一位置Aを通過するようにし、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの瞳上の位置B'に達するように構成する。このようにして、対物レンズの瞳上にあるB'の位置、もしくは蛍光検出光路内にあり上記対物レンズの瞳と共役な面上のB'の像位置、に反射励起光を遮光する手段を施すことにより雑音成分となる励起光を蛍光検出信号から除去する。

~~{0012}~~

また上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの瞳上でほぼ同一位置Aを通過し、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの瞳上の上記Aとは異なる位置Bを通過するように構成する。このようにして対物レンズの瞳もしくは、蛍光検出光路内で対物レンズの瞳と共役な位置にBを中心に所望の径の反射励起光を遮光する部材を配置する。このようにして雑音成分となる励起光を蛍光検出信号から除去する。

~~{0013}~~

更に上記遮光する反射励起光を正反射励起光にし、DNAチップ内の異物から

ファイル名 = D99007021A1.el

散乱した励起光が上記遮光手段又は遮光部材外から透過するようにして取り出し、取り出された散乱光を上記蛍光検出光路から分岐し、DNAチップの照射スポットと共役な位置で撮像して、検出する。検出した散乱光の像の撮像情報を用いて、上記蛍光検出手段で検出した蛍光情報を補正する。このようにすることによりDNAチップ内に存在する異物からの散乱光の影響を排除して正確な検出が可能になる。

~~[0014]~~

上記M個のマルチ励起スポット光をレーザ光源で形成する。このようにすることにより微小なスポットに強度の大きい励起照射が実現する。またM個のマルチ励起スポット光を複数の半導体レーザ光源により形成することにより、小さな実装体積でより大きな励起照射が実現する。この際上記複数の半導体レーザ光源より出射した光を光ファイバに導入し、M個の所望のピッチで整列した当該光ファイバの出射端から出射する構成にする。このようにすることにより所望のピッチ配列であるM個のマルチ励起スポット光を得ることが可能になる。

~~[0015]~~

光信号蓄積型撮像手段として超高感度の $N_x \times N_y$ 画素数からなる2次元撮像装置を用い、 n_x 、 n_y を整数とし、スポット径dの励起光をx方向に $n_x d$ 、y方向に $n_y d$ のピッチで $N_x \times N_y$ スポット同時に照射する。このようにして得られる $N_x \times N_y$ からなる蛍光スポット像を超高感度2次元撮像装置で検出し、かつ検出装置とDNAチップとの相対位置をピッチdでxy方向に $n_x \times n_y$ ステップ移動する。このようにすることによりDNAチップの所望の領域を検出することが可能になる。

~~[0016]~~

また上記励起光は複数の異なる波長からなり、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して検出する。更に上記複数の波長からなる励起光を同時に照射し、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して同時に検出する。このようにすることにより多様な検出対象を高速に行うことが可能になる。

~~[0017]~~

上記被検査DNAチップの所望の蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイ

ゼーションした検査面上に、上記励起スポット光の近傍に第2の光を斜め入射させ、該検査面で反射した光の位置を検出することにより焦点検出する。この検出情報に基づき検査面と上記対物レンズの相対距離を制御することにより焦点合わせを行うことが可能になる。また、上記第2の斜め入射させる光が対物レンズを通過するように構成することにより、簡単な構成で焦点検出、制御が可能になる。

~~[0018]~~

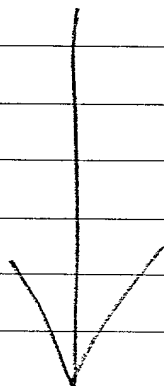
上記第2の斜め入射させる光を検出面にたいしS偏光にする。このようにすることにより、蛍光検出面での反射率を高め、正しい焦点検出が可能になる。更に上記第2の斜め入射させる光は上記蛍光体を励起しない波長を用いる。このようにすることにより、蛍光検出信号に雑音を重畳させずに正確な検出が可能になる。

~~[0004]~~

本発明の目的は、~~のよう~~な従来のマルチスポット光形成方法における光の利用効率が悪く、マルチスポット光間の強度のばらつきが大きいという課題を解決し、ほぼ均一な強度のマルチスポット光を得る方法及びその装置を提供することにある。

~~[0005]~~

更に本発明の目的は、ほぼ均一な強度のマルチスポット光を用いて、共焦点検出、蛍光検出及びDNA検査を行う方法及びその装置を提供することにある。



~~【0006】~~

【課題を解決するための手段】

従来
上記

の課題を解決し、近接したマルチスポット光を得るために、本発明は以下の様な構成にした。

~~【0007】~~

即ち、ほぼ同一方向に向かい、隣同士が比較的近接している複数 N のレーザービームを、偏光素子に入射させることにより、この各ビームの2つの互いに直交する偏光成分のビームに分離することにより複数 $2N$ のレーザービームとする。その後、ほぼ同一方向に向かい、隣同士が近接している複数 $2N$ のレーザービームにする。

09676652-1004007

ファイル名 = D00000201A1.el

~~{0008}~~

このような2倍の近接するビームを得る具体的方法として、複数 N の近接するレーザビームを、偏光ビームスプリット面と、この偏光ビームスプリット面に平行で、該偏光ビームスプリット面から L_1 及び L_2 の距離にある全反射面とを有するマルチスポット光2倍化プリズムで構成された上記偏光素子に入射する。このようにすれば、前記複数の近接するレーザビーム数を2倍の $2N$ にすることができる。

~~{0009}~~

また複数 N の近接するレーザビームを、異方性光学媒体からなる上記偏光素子に入射し、該異方性光学媒体内を各ビームの2つの互いに直交する偏光成分のビームに分離することにより複数 $2N$ のレーザビームとする。このようにすればほぼ同一方向に向かい、隣同士が近接している複数 $2N$ のレーザビームにすることが可能になる。

~~{0010}~~

更に上記のようなビームを2倍化する偏光素子を複数 M 用いることにより $2^M N$ のレーザビームを得ることが可能になる。

~~{0011}~~

上記1個以上の偏光素子の少なくとも1個に入射する複数 N の近接するレーザビームはそれぞれ収束レーザビームである様にと、この収束ビームの収束位置で微小マルチスポット光が得られる。この際この収束ビームは複数配列されたレンズにより形成することでマルチスポット光が形成される。

~~{0012}~~

また上記収束レーザビームの収束位置に $1 \leq M' \leq M$ を満たす整数 M' に対し $2^{M'} N$ 個以上のマルチスポット光収束径程度の開口を並べたマスクを配置し、この開口にマルチスポット光が集光するようにすれば雑音迷光のない純粋な微小マルチスポット光を得ることが可能になる。

~~{0013}~~

上記の複数 N のレーザビームはレーザ光源出射ビームもしくは平行ビーム化された半導体レーザのビーム径 d に対し、 $4d$ 以下の隣接間隔ピッチを有する場合

ファイル名 = D00000201A1.el

でも2倍化することが可能であり、また2倍化して隣接ビーム間隔を更に $1/2^M$ にすることが可能である。即ち平行光束のレーザービームの径dより小さなピッチのマルチスポット光をレンズ系を用いずに形成することができる。

~~{0014}~~

上記した複数Nのレーザービームの形成方法として、斜辺が出射面に対しほぼ45度になる断面を有する三角形とこの斜面に接触しこの斜面と平行な全反射面を有する平行四辺形の断面を有する第2のビーム2倍化プリズムを1個以上設ける。このようにすれば例えばN/2個のレーザービームをこの第2のビーム2倍化プリズムにより複数Nのレーザービームを形成できる。

~~{0015}~~

更に、上記第2のビーム2倍化プリズムを異なる寸法からなる2種以上のものを用い、これをビームの進行方向から順次大きいものから小さいものにn段のカスケード状に並べビーム数を 2^n 倍化する。即ち最終段のビーム2倍化プリズムの寸法をDとし他とき、この数をN/2、その前の段のビーム2倍化プリズムの寸法を2Dとしその数をN/4、初段の寸法を $2^{n-1}D$ とし、その数をN/2ⁿとする。このようにすると、N/2ⁿ⁺¹個のわずかなビームからN個のレーザービームが得られる。

~~{0016}~~

以上説明した方法により、1個又は複数のレーザー光源より出射したレーザービームからマルチスポット光が得られる。しかもビームの2倍化の方法は何れも1ビームを偏光素子やビーム分割プリズムで行っているため、2分化後のビームのエネルギー総和は元のビームエネルギーの92%以上にする事が可能であり、収束ビームを作るレンズやこれら偏光素子の表面での反射ロス等を考慮しても各出射レーザーエネルギーを総和した全エネルギーの70%以上がマルチスポット光の合計エネルギーにすることが可能になる。

~~{0017}~~

更に上記の光学部品の表面での反射損失を反射防止コート等で行うことにより1個以上のレーザー光源より出射したレーザービームの各出射レーザーエネルギーを総和した全エネルギーの90%以上がマルチスポット光の合計エネルギーになる様

ファイル名 = D00000201A1.e1

にできる。

~~{ 0 0 1 8 }~~

ガウス分布のいろいろな場所の部分からマルチスポットを形成する従来の方法に比べ、ビームの分割を容易に均等にでき、マルチスポット光の各スポットエネルギーのばらつきが $\pm 20\%$ 以内にする事ができる。

~~{ 0 0 1 9 }~~

しかも上記の偏光素子に入射する光の偏光状態を適正化したり、多層膜タイプの偏光ビームスプリッタの膜厚を適正化することにより2倍化されたビームの強度をほぼ等しくすることが可能になり、マルチスポット光の各スポットのエネルギーばらつきが $\pm 10\%$ 以内にする事ができる。

~~{ 0 0 2 0 }~~

以上説明したレーザビームの $2^{M'}$ 倍化により、近接したマルチ微小スポットを形成することが可能になるので、このようにして得られたマルチスポット光を共焦点検出、蛍光検出、あるいはDNA検出等に用いる。これにより、従来不可能であった光の利用効率の高い、またマルチスポット光間のばらつきが小さい検出ができるようになり、その結果高速で高精度の共焦点検出、蛍光検出、あるいはDNA検出等が可能になる。

~~{ 0 0 2 1 }~~

上記した本発明のマルチスポット光形成手段を用いて作られたマルチスポット光を被観測物体に投射し、被検査物体で反射もしくは透過した光を上記投射スポットが結像する位置に配置したマルチ開口で透過させる。この各開口の透過光をそれぞれ個別に検出する。このようにして共焦点検出することにより光の利用効率が高く、マルチスポット光間のばらつきが少ない共焦点検出が可能になり、高速高精度の共焦点検出が実現する。

~~{ 0 0 2 2 }~~

上記した本発明のマルチスポット光形成手段を用いて作られたマルチスポット光を励起光とし、蛍光体を含む被観測物体に投射する。この励起光により被検査物体で発生した蛍光を励起光から分離し、上記励起光投射スポットで発生する蛍光が結像する位置に検出器を配置することにより各マルチスポット光位置の蛍光

ファイル名 = D00000201A1.el

を検出する。このようにすることにより、複数の位置に強度の高い励起光を同時に照射することができ、また各スポットのばらつきが小さいので、高速、高精度の蛍光検出が可能になる。

~~{0023}~~

上記の蛍光検出において、上記励起光投射スポットで発生する蛍光が結像する位置に配置したマルチ開口で透過させ、各開口の蛍光透過光を個別に検出する検出器を配置する。このようにすることにより励起光で発生する被観測物体以外の蛍光を排除し、信号対雑音比の高い蛍光検出が可能になる。

~~{0024}~~

上記した本発明のマルチスポット光形成手段を用いて作られたマルチスポット光を励起光とし、蛍光体を付加したDNAを含む被観測物体に投射する。被観測物体はガラス等の基板の予め決められた位置に既知のプローブDNAを付着させておき、被検査対象である生体試料から精製増幅したDNAの一端に蛍光物質を付加したターゲットDNAを上記ガラス基板上に流し、プローブDNAの塩基配列に対応するターゲットDNAをハイブリダイズされたものである。この被測定物体にマルチスポット光励起光を照射し、DNAに付加した蛍光体を励起し、蛍光を発生させる。この蛍光を励起光から分離し、上記投射スポットで発生する蛍光が結像する位置に検出器を配置することにより各マルチスポット光位置の蛍光を検出し、検出した位置と検出信号強度からDNAを検査する。

~~{0025}~~

上記のDNA検査において、上記励起光投射スポットで発生する蛍光が結像する位置に配置したマルチ開口で透過させ、各開口の蛍光透過光を個別に検出することにより各マルチスポット光位置の蛍光強度を検出することによりDNAを検査することにより更に信号対雑音比の大きなDNA検査ができる。

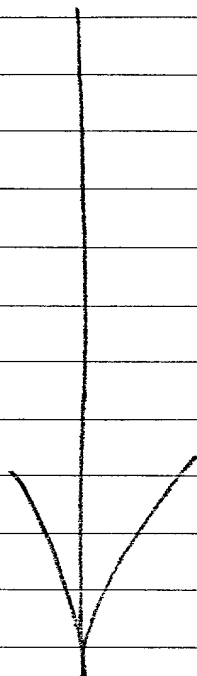
~~{0026}~~

蛍光検出及びDNA検査においては励起光と蛍光の波長が比較的接近する場合が多い。このような場合マルチスポット光を用いると検出及び検査の視野が大きくなり、各マルチスポット励起光で発生する蛍光を検出系に導く途中に挿入する励起光から蛍光を分離する光学系の特性が不十分になる。即ち 結像光学系から

09678652 100400

検出器に至る途中に投入される波長分離ビームスプリッタや干渉フィルタ等の励起光から蛍光を分離する光学系に入射する蛍光の入射角が各スポットで異なってしまう。その結果マルチスポット光の場所により、遮蔽すべき励起光が洩れてしまい正確な蛍光検出ができなくなる。

上記課題を解決するため上記蛍光を励起光から分離する方法は、波長分離ビームスプリッタを用いると共に、各マルチスポット光励起で発生する蛍光が結像光学系から結像位置に至る各スポットからの蛍光の主光線が互いに平行となるテレセントリック結像光学系にし、該結像光学系と結像位置の間に干渉フィルタ又は及び波長分離ビームスプリッタを挿入する。このようにすれば、どのスポット励起光からの蛍光も干渉フィルタや、波長選択ビームスプリッタに同一の入射角で入射する。この結果どのスポットからの蛍光及び雑音成分となる励起光も同一条件で、従って最適な条件で、それぞれ蛍光を選択し、励起光を除去することができ、励起光漏れの極めて小さい、従ってノイズの極めて少ない蛍光検出ができる。以上の結果、更にこの蛍光検出法を用いて、励起光の反射光強度に対し極めて微弱な強度の蛍光を検出する必要があるDNA検査を正確に高精度にできるようになる。



従来

本発明の目的は、~~上記~~の問題を解決し、高分解能、高速化を同時に達成することのできるDNAプローブアレイ等における蛍光標識物の分布計測装置を提供することである。

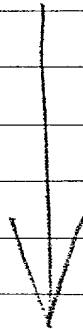
~~{0006}~~

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成する本発明による蛍光標識物の分布計測装置は、基板上の試料面に捕捉された蛍光標識物の発光パターンを走査して読みとる蛍光標識物の分布計測装置において、読み取り対象の基板を載せるステージと、基板上の試料面に複数の照射スポットを当該照射スポットの径より大きな指定の間隔で形成する手段と、ステージを移動させる移動機構と、試料面上の複数の照射スポット部より生じる発光を集光し検出する集光検出手段と、複数の照射スポットの形成位置に応じて試料面のほぼ全面を照射するように移動機構を制御する制御手段と、集光検出手段からの信号を処理して試料面の画像を再構成する処理手段とを含むことを特徴とする。複数の照射スポットの強度は実質的にほぼ同じとする。

~~{0007}~~

複数の照射スポットを形成する手段は、励起光源として少なくとも一個のレーザ光源を含み、励起光源からの光を分割して試料面上に隣接する照射スポットの間隔が1mm以下になるように並べて結像するものとすることができる。励起光源からの光を分割する手段は、分割プリズム、光学異方性媒体、光ファイバ又は



ファイル名 = A00011581A1.el

偏光ミラー、あるいはこれらの組み合わせを含んで構成することができる。

~~{ 0 0 0 0 8 }~~

複数の照射スポットを形成する手段は、また、 N 個 ($N \geq 1$) の励起光源と M 段 ($M > 2$) の 2 分割手段を備え、 $N \times 2^M$ 個の照射スポットを形成するものとする。2 分割手段としては、分割プリズム、光学異方性媒体、光ファイバあるいは偏光ミラーを用いることができる。

~~{ 0 0 0 0 9 }~~

複数の照射スポットを形成する手段は、また、複数のレーザ光源と複数の光ファイバを備え、複数の光ファイバの出射端を一直線上に配置することで複数の照射スポットを形成するように構成することができる。

複数の照射スポットはほぼ一定間隔で一直線上に位置するのが好ましい。

集光検出手段は、複数の照射スポット部より生じる複数の蛍光発光を集光しほぼ同時に検出するもので、波長選択フィルタを備え、複数の照射スポット部より生じる発光のうち励起成分と蛍光成分とを分離し蛍光成分を検出する。集光検出手段は、複数の照射スポット部より生じる発光が結像する位置に照射スポット部の数と同数のピンホールを備え、該ピンホールを通過する光を検出するようにすることができる。

~~{ 0 0 1 0 }~~

制御手段は、ステージを特定の 1 軸方向に、第 1 の微小幅毎のステップ的な移動 n 回と、それに続く第 1 の微小幅に比べて大きな第 2 の幅のステップ移動 1 回を単位として移動させ、これを繰り返して試料面を走査する方式によって試料面の全面を計測することができる。より具体的には、照射スポットの並び方向への移動を照射スポット間隔の $1/n$ (n : 整数) の幅毎のステップ的な移動 $n-1$ 回と、それに続く、(励起スポット群の両端の幅 + 第 1 の幅) のステップ移動 1 回を単位として、これを繰り返して試料面を走査するようにステージ移動を制御することができる。

~~{ 0 0 1 1 }~~

集光検出手段からの信号を取り込みは、ステージが複数の照射スポットの並び方向と直角方向に移動しているときに行うのが望ましい。

複数の照射スポットを形成する手段は、複数の照射スポット部を同時に形成する必要があり、試料面に光を結像するために、開口数0.7以上、有効視野1.0mm径以上、試料面とレンズ先端との距離0.7mm以上である集光レンズを使用する。

~~(0012)~~

複数の照射スポットを形成する手段は、光軸方向の長さが異なる複数の光学異方性媒体又は結晶軸方向が各々異なる光学異方性媒体と、光学異方性媒体同士の間配置された波長板とを備えて構成することができる。

複数の照射スポットを形成する手段は、また、複数の光学異方性媒体と波長板とを交互に配置した素子を備え、各光学異方性媒体の光の進行方向の長さがその直前の光学異方性媒体の長さの約半分であるように構成することができる。

~~(0013)~~

複数の照射スポットを形成する手段は、また、励起光源からの光を走査して整列させた複数の光ファイバの一端に順次入射させ、光ファイバの出射端を一直線上に配置することで複数の照射スポットを形成するようにしてもよい。

また、各照射スポットの検出信号毎に強度補正を行う機能を設けるのが好ましい。

~~{0005}~~

本発明は、~~それら従来の課題を解決し~~、微弱な蛍光を2次元の大きな解像本数を必要とする検出対象物に対して、高速、高分解能にかつ高感度に検出する技術を提供する。またこの技術を用いて、高感度高速にDNAを検査する技術を提供する。

~~{0008}~~

~~【課題を解決するための手段】~~

~~目的を達成するための~~
上記の課題の解決方法として本発明は以下の手段を用いている。

~~{0007}~~

蛍光特性を有する対象物体に多数Mの微小なスポットからなるマルチスポット励起光を照射する。この励起光により得られる各マルチスポットからの蛍光を励起光から分離し、この対象物体から発する蛍光像をフォトンカウント可能な複数の微弱光検出素子で検出する。このようにすれば非常に微弱な蛍光でも検出できる。各検出素子から得られるフォトン信号をそれぞれ個別にフォトンカウントし、各検出素子で検出されたフォトンカウント数 N_{pm} を個別に記憶する。さらにマルチスポット光と対象物体との位置を相対的に駆動系等により変化させ、各検出器のフォトンカウント数を順次記憶して行く。このようにして対象物体上の所望の範囲に亘りフォトンカウント数データを記憶収集してゆけば、この収集デー

ファイル名 = D00005301A1.el

タから蛍光画像を構成することができる。

~~(00008)~~

また上記マルチスポット光の代わりにシート状励起光を用いる。このシート状励起光を照射することにより得られる長細い形状を有する照射領域からの蛍光を励起光から分離し、該対象物体から発する蛍光像をフォトンカウント可能な複数の微弱光検出素子で検出する。各検出素子から得られるフォトン信号をそれぞれ個別にフォトンカウントし、各検出素子で検出されたフォトンカウント数 N_{pm} を個別に記憶する。シート状励起光による細長い形状を有する照射領域と該対象物体との位置を相対的に変化させ、各検出器のフォトンカウント数を順次記憶して行く。このようにして対象物体上の所望の範囲に亘りフォトンカウント数データを記憶収集してゆけば、この収集データから蛍光画像を構成することができる。

~~(00009)~~

マルチスポット又はシート状励起光を照射し同時に M 絵素の蛍光を検出することにより従来の課題で示した上記1分で 6000×6000 画素を検出するには1絵素当たり $M \sim 2M \mu\text{sec}$ の時間をかけることが可能になる。例えば $M = 50$ ならこの時間は $50 \sim 100 \mu\text{sec}$ となり、上記の蛍光発生遅延の問題を解決できる。またダイナミックレンジを確保し、かつ高感度の検出が下記理由により可能になる。

~~(00010)~~

即ち、1絵素当たりの検出時間が $1 \mu\text{sec}$ 程度であると高感度検出を行うに必要なフォトンカウントの計数時間に足る検出時間が短くなり、ダイナミックレンジの確保が困難になる。これは1フォトンを検出したときに発生するフォトンパルス信号のパルス幅が数十 ns であるため、 $1 \mu\text{sec}$ の時間内ではせいぜい数十パルスの信号しか検出できないためである。またこのような短い時間で蛍光強度をアナログ的に検出しようとしても、検出回路の周波数特性から十分なダイナミックレンジを確保して検出することは困難である。

~~(00011)~~

上記の対象物として蛍光分子を付加したDNA断片を対応するDNAに結合さ

ファイル名 = D00005301A1.e1

せたサンプルを用いて以下のようにして検査する。一例として検査対象がDNAチップの場合、先ず検査対象であるDNAから前処理により作成したDNA断片に所望の蛍光体を付加したターゲットを上記DNAチップにハイブリダイゼーションする。このハイブリダイゼーションされた被検査DNAチップに、多数Mの微小なスポットからなるマルチスポット励起光を照射することにより得られる各マルチスポットからの蛍光を励起光から分離する。分離したDNAチップから発する蛍光の像をフォトンカウント可能な複数の微弱光検出素子で検出する。各検出素子から得られるフォトン信号をそれぞれ個別にフォトンカウントし、各検出素子で検出されたフォトンカウント数 N_{pm} を個別に記憶する。さらに上記マルチスポット光と該DNAチップとの位置を相対的に変化させて上記各検出器のフォトンカウント数を順次記憶していく。このようにして上記DNAチップ上の所望の範囲に亘りフォトンカウント数データを記憶収集し、この収集データから蛍光画像を構成することによりDNAを検査する。

~~100012~~

上記マルチスポット光に代えてシート状ビームを用いても、上記蛍光検出でシート状ビームを用いる蛍光検出で説明したのと同様にターゲットDNAに付加した蛍光を検出することにより、DNA検査を行うことができる。

~~100013~~

上記対象物体に照射されるマルチスポット励起光又はシート状の励起光の最小絞り径となる位置にある物体面からの蛍光像の合焦点位置にマルチスポット像またはシート状の細長い領域像のみを通過せしめるマルチスポット開口または細長い開口を配置し、共焦点検出する。このようにすることにより、信号対雑音比の大きい共焦点画像が得られる。即ち、検出したいマルチスポット位置の蛍光、或いはシート状ビームの位置の蛍光を、それ以外の光路中に存在する蛍光物質等の背景にある蛍光雑音から影響を受けずに、低雑音で検出できる。蛍光検出を行うサンプルが2次元平面内にあるときにはマルチスポットとサンプルをこの平面内で相対位置変化させ共焦点検出を行えば、この平面外にある蛍光体による雑音の影響を殆ど受けずに信号対雑音比の大きな蛍光検出或いはDNA検査を行うことができる。

ファイル名 = D00005301A1.e1

~~{0014}~~

上記マルチスポット光を用いる蛍光画像検出で、マルチスポットと対象物の相対位置変化を対象物体面内の2方向と対象物体面に垂直な方向の計3方向のうち少なくとも1方向に行う。特に上記の共焦点検出の場合、マルチスポットの最小絞り込み位置、或いはシートビームの最小絞り込み位置から対象物を光軸方向に相対位置変化させることにより、得られる蛍光像強度の変化から合焦点位置を求め、この位置での蛍光強度から表面に凹凸のある対象に対して、正しい蛍光強度情報と、表面凹凸情報、或いは蛍光を発している3次元的な位置情報を得ることが可能になる。

~~{0015}~~

上記従来の1スポット励起光の場合における問題点で示したように、高速に蛍光画像を検出するためマルチスポット光の数は多いほど有利である。Mは10以上にするとこの時間内で検出できる最大のフォトンカウント数は数百と大きくなり、高感度、広ダイナミックレンジを実現する上で有効である。DNA検査等では更に高速化を行うためスポットの複数化の効果は大きく。Mを50以上にすると更に良い。即ちMを50以上にすると例えば6000×6000画素を1画素当たり数十μsかけて検出し、全画素を1分以内で検出することが可能になる。

~~{0016}~~

上記マルチスポットは、複数の検出素子、とりわけ1ないし2次元の直線上に配列した検出素子で検出するため、また検出した複数の情報を対象物或いはDNAチップの位置情報に対応させ蛍光画像として出力するため1又は2次元の直線上に配列させる。

~~{0017}~~

上記マルチスポット励起光またはシート状励起光と対象物の相対位置変化を行い1画素分の移動をおこなう周期をTdとする。このとき(周期Tdを)上記フォトンカウント信号の単独フォトン検出時のパルス幅Δt0で割った値、即ちTd/Δt0に1以下0.1以上の所望の係数αを掛けた値、即ちαTd/Δt0を求める。この値が上記フォトンカウント数Npmに達していることを判断基準にして、即ち、αTd/Δt0 ≥ Npmの時上記マルチスポット励起光またはシート状励起光の

ファイル名 = D00005301A1.e1

強度を変化させる等の方法により、蛍光検出強度が小さくなるようにしてフォトンカウントができるようにして検出を行う。即ち1絵素を検出する時間をフォトンパルス時間幅で割った値の α 倍以上のフォトンカウントは精度の点で不可能であるため、励起光を小さくしたり、或いは励起光照射時間を短くし実効的に励起光強度を小さくしたり、或いは検出蛍光を小さくするため検出素子のゲインを小さくし、実効的にフォトンカウント可能なフォトンカウント値にする。

~~{0018}~~

上記マルチスポット光またはシート状励起光を2波長以上の多色光にする。このようにすることにより蛍光検出の情報を多くし、蛍光検出機能、DNA検出機能を向上させる。

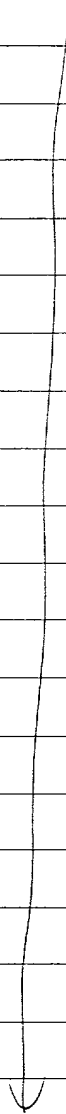
~~{0019}~~

また、上記フォトンパルス信号がハイレベルにある時間を1絵素分の検出時間 T_d 以内の時間 βT_d に亘り加算計測する。この値を T_h' とすると、1以下の所定の γ に対し、 $T_h' \geq \gamma \beta T_d$ の条件を満足するか否かを判定する。仮にこの式を満たすとき、上記検出素子の出力信号をアナログ的に積分する回路で積算した結果を用いる。このようにすることにより強い蛍光にたいしても検出できるようになる。即ち、フォトンカウントが不可能な強い蛍光を検出しても、アナログ的に積分することにより強い蛍光の検出が可能になる。しかも、アナログ検出の時間を T_d 以内にすれば、1絵素当たりの検出時間を変えずに全絵素に亘り検出できる。この結果、フォトンカウントを用いる微弱な蛍光からこの積分回路によるアナログ積分検出を用いる強い検出強度までの広いダイナミックレンジに亘り高精度にかつ、高速に検出することが可能になる。また上記 α が1に相当する検出法として、フォトンカウントとアナログ積分検出を同時に並行して行い、得られた両結果を比較判断して、何れかの検出結果を用いる。

~~{0020}~~

また、上記の励起光源としてレーザを用いる。このレーザの共振器内にマルチスポット発生ホログラム又はシートビーム発生ホログラムを配置し、レーザ共振器内の強力なレーザ光でマルチスポットを発生させる。通常レーザの共振器内の光エネルギーは出射するビームのエネルギーの10倍以上になっている。通常の

レーザでは出射ウィンドウのミラーの反射率は約90%にし、残り約10%を出射光として取り出している。この出射ウィンドウの反射率を100%にし、光を共振器内に閉じこめ、この共振器内の光路にホログラムを配置することにより、ホログラムの回折効率約10%をマルチスポット光もしくはシート状ビームとして利用することができる。この結果従来のレーザ出射光路中にホログラムを配置する場合に比べ、10倍近い強度のマルチスポット光もしくはシート状ビームが得られ、高速高感度の蛍光検出、並びにDNA検査を行うことが可能になる。



~~{0065}~~

~~【発明の効果】~~

本発明によりレーザ光源より発したレーザ光を非常に効率よく、無駄なく、マルチスポット光にし、かつ各マルチスポット光のばらつきが非常に少なくできるようになった。この結果このマルチスポット光を用いて高速、高精度の共焦点検出が可能になった。またこのマルチスポット光を用いて高速、高精度の蛍光検出、並びにDNA検査が可能になった。

~~{0065}~~

~~【発明の効果】~~

以上説明したように本発明により、~~1絵素から数カウントのフォトンパルスが得られるような微弱な蛍光検出物体、とりわけDNA検査で用いられるDNAマイクロアレイを高速に高分解能、高感度で検出することが可能になった。~~またアナログ積分検出をも可能にし、非常に広いダイナミックレンジを有する検出が可能になった。即ち、例えば6000×6000絵素の蛍光画像を 2^{16} のダイナミックレンジで1分の検出時間で検出することも可能になった。この結果DNAチップなどの検査対象を1分程度の検査時間で検出することが可能になり、広く行われている集団検診で採取される大量の検体サンプルを短時間でかつ正確に検査することが可能になる。

~~{0066}~~

また本発明はDNA検査にのみ適用されるわけではなく、蛍光検出顕微法に広く使われる。従来長い時間を要していた観察や、検査の時間を大幅に短縮する。即ち数フォトンしか検出されない微弱光まで短時間で検出できるようになった。また微弱光から強い検出光まで広い範囲に亘り短時間で高精度に検出できるようになった。

~~【図面の簡単な説明】~~ Brief Description of Drawings

【図 1】

本発明の実施形態を表す図。

【図 2】

本発明の実施形態図で、マルチスポット照射を表す。

【図 3】

本発明の実施形態図で、マルチスポット照射の移動を表す。

【図 4】

本発明の実施形態図で、マイクロレンズアレイによるマルチスポット発生を表す。

【図 5】

本発明の実施形態図で、図 1 の実施形態を説明する図。

【図 6】

波長選択ビームスプリッタ固定時のスポット蛍光像の動きを説明する図。

【図 7】

波長選択ビームスプリッタ偏向時のスポット蛍光像の動きを説明する図

【図 8】

~~本発明の実施形態~~、図 1 の各部品動作、検出信号等を表す図。

【図 9】

図 1 の実施形態で、蛍光像検出面の像の動きを表す図。

【図 10】

図 1 の実施形態で蛍光検出面の受光開口を表す図。



ファイル名 = D99007021A1.el

【図 1 1】

本発明の実施形態図で、マルチスポットをホログラムで形成する図。

【図 1 2】

図 11 のホログラムを作成する方法を示す図。

【図 1 3】

本発明の実施形態を示す図。

【図 1 4】

図 1 3 の実施形態で用いる 2 次元マルチスポット発生用マイクロレンズアレ。

【図 1 5】

本発明の実施形態で波長分離ビームスプリッタの特性を示す図。

【図 1 6】

本発明の実施形態で干渉フィルタの特性を示す図。

【図 1 7】

本発明の実施形態図で、励起光を空間フィルタで遮光する図。

【図 1 8】

図 17 の空間フィルタの図。

【図 1 9】

本発明の実施形態図で、偏向を利用する励起光遮光法を示す図。

【図 2 0】

本発明の実施形態図で、1 次元スポットアレイを 2 次元マルチチャンネルフォトマルで検出する図。

【図 2 1】

図 2 0 の実施形態でファイバの入出射端とスポット像取り込みを示す図。

【図 2 2】

本発明の実施形態図で、励起光を複数の波長にして検出する図。

【図 2 3】

本発明の実施形態図で、複数の半導体レーザを励起光に用いる図。

【図 2 4】

本発明の実施形態図で、ファイバの出射端からマルチスポット光を得る図。

ファイル名 = D99007021A1.el

【図 25】

本発明の実施形態図で、1本のレーザビームからマルチスポットを得る図。

【図 26】

本発明の実施形態図で、励起光を複数の波長にして同時に検出する図。

【図 27】

本発明の実施形態図で、マルチスポット光を斜め照射し、正反射励起光を瞳上で遮光する図。

【図 28】

上記図 27 の瞳上の遮光部を示す図。

【図 29】

本発明の実施形態図で、励起散乱光を検出し異物位置を求め、蛍光検出結果を補正する方法を示す図。

【図 30】

上記図 29 の対物レンズと DNA チップの間の励起正反射光と散乱励起光を示す図。

【図 31】

図 29 の異物散乱光の検出信号による補正の方法を示す図。

【図 32】

本発明の実施形態図で、フォーカス検出と、制御を示す図。

【図 33】

図 32 のフォーカス検出で、DNA チップの反射呼応を示す図。

【図 34】

本発明の実施形態図で、対物レンズを通してフォーカス検出する図。

【図 35】

本発明の実施形態で、DNA チップの全検査対象域を検出する方法を示す図。

【図 36】

図 35 の実施形態の拡大説明図

【図 37】

図 35 の実施形態の拡大説明図

【図 3 8】

図 3 5 の実施形態でマルチスポットの動きを示す図。

【図 3 9】

図 3 5 の実施形態で DNA チップチャックの x 方向の動きを示す図。

【図 4 0】

図 3 5 の実施形態で DNA チップチャックの y 方向の動きを示す図。

〔図面の簡単な説明〕

41A
【図 41】

本発明によるマルチスポット光形成手段の 1 実施形態の構成を示す正面図。

図 41B, 41C, 41D は、

図 41A の 部分 拡大 図

42
【図 2】

本発明によるマルチスポット光形成手段の 1 実施形態の構成を示す正面図。

43
【図 3】

本発明によるマスクの 1 実施形態を示すマスクの正面図。

44
【図 4】

本発明によるマルチスポット光形成手段の 1 実施形態の構成を示す正面図。

45
【図 5】

本発明による蛍光検出および DNA 検査装置の 1 実施形態の構成を示す斜視図。

【^{4/}図6】

本発明によるマルチスポット形成手段の1実施形態を示す正面図。

【^{4/}図7】

本発明による2次元マルチスポット形成手段の1実施形態を示す正面図。

【^{4/}図8】

本発明による2次元マルチスポット光の配列の1例を示す正面図。

【^{4/}図9】

本発明による共焦点検出装置の1実施形態を示す正面図。

【^{5/}図10】

本発明による共焦点検出のマルチスポット光とステージ走査の関係を示す図。

~~【図面の簡単な説明】~~

【^{5/}図1】

本発明による蛍光標識物の分布計測装置の一例の全体構成を示す模式図。

【^{5/}図2】

本発明によるマルチ光源分配ユニットの構成例を示す図。

【^{5/}図3】

本発明によるマルチ光源分配ユニットの他の構成例を示す図。

【^{5/}図4】

本発明によるマルチ光源分配ユニットの他の構成例を示す図。

【^{5/}図5】

本発明によるマルチ光源分配ユニットの他の構成例を示す図。

【^{5/}図6】

本発明によるマルチ光源分配ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁵7】

本発明によるマルチ光源分配ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁵8】

本発明によるマルチ検出ユニットの構成例を示す図。

【図⁵9】

本発明によるマルチ検出ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁶10】

本発明によるマルチ検出ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁶11】

本発明によるマルチ検出ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁶12】

本発明によるマルチ検出ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁶13】

本発明によるマルチ検出ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁶14】

計測される画像の一例を示す図。

【図⁶15】

X Y Z 駆動ユニットの動作例の説明図。

【図^{66A, 66B}16】

X Y Z 駆動ユニットのx y 軸の動作曲線図。

【図⁶17】

マルチ光源分配ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁶18】

マルチ光源分配ユニットの他の構成例を示す図。

【図⁶19】

マルチ光源分配ユニットの他の構成例を示す図。

〔図面の簡単な説明〕

【図⁷⁰~~70~~】

本発明によるDNAチップの検査装置の概略構成を示す斜視図である。

【図⁷¹~~71~~】

本発明によるDNAチップのセルと励起光の関係を表すセルの平面図である。

【図⁷²~~72~~】

本発明によるDNAチップのx y方向の走査を説明する図である。

【図⁷³~~73~~】

本発明によるDNAチップのx方向の走査とフォトン検出の関係を示す図である。

【図⁷⁴~~74~~】

微弱光のフォトンカウント信号を示す図である。

【図^{75A-75D}~~75~~】

強い検出光の場合のフォトンパルス信号を示す図である。

【図⁷⁶~~76~~】

本発明による広いダイナミックレンジを検出する回路構成を示すブロック図である。

【図^{77A-77E}~~77~~】

本発明による弱い検出光と強い検出光の判定方法を示す図である。

【図^{78A, 78B}~~78~~】

本発明による更に強い検出光を検出する方法を示す図である。

【図⁷⁹~~79~~】

本発明によるシート状の励起光を用いた場合を示すDNAチップのセルの平面図である。

【図⁸⁰~~80~~】

本発明によるマルチスポットをレーザ共振器内のホログラムで形成する例を示す光学系の一部の斜視図である。

~~{0019}~~~~{発明の実施の形態}~~

図1は、本発明の実施形態を示す図である。1は蛍光検出のために、マルチスポット励起光形成し、DNAチップ2に照射するマルチスポット励起光照射系であり、3はマルチスポット励起光で発生した蛍光を検出する蛍光検出系である。

11は励起光光源と励起光のビーム成形光学系を含む励起光源である。He-Neレーザ光を焦点距離の異なる2個のシリンドリカルレンズで所望の縦横ビーム径比に成形し、ミラー1000を經由しA〇偏向器^{√2}に入射させる。A〇偏向器^{√2}には水晶振動子に印加する周波数 ω の高周波電圧端子とこの周波数より低い振幅信号 ω_V の入力端子がある。

~~{0020}~~

制御回路^{装置}4から送られる周波数 ω の信号は $\omega \pm \omega_0$ の範囲の周波数帯を持っている。周波数が変わるとA〇偏向器^{√2}に入射する励起光の回折角が変わる。また制御回路4から振幅信号 ω_V を入力すると回折効率が変わるので、回折光の強度を制御することができる。A〇偏向器を通った回折光は0次光（図示せず）と分離され（0次光は遮光される）、焦点距離 f_1 と f_2 の2つのレンズ131と132からなるレンズ系13により所望のビーム系でマイクロレンズアレー14を照



ファイル名 = D99007021A1.el

射する。A O 偏光器¹²の周波数を変化させると、マイクロレンズアレー 1 4 に入射する励起光の位置は変わらずに角度が変化する。

~~{0021}~~

図 4 はマイクロレンズアレー 1 4 の拡大詳細図である。ガラスでできた微小マイクロレンズが 1 次元状に 3 2 ~ 2 5 6 個、多数並んでおり、ここに入射した光は、例えば実線で示す 1 0 1 0 はマイクロレンズを透過し、各マイクロレンズ 1 4 1, 1 4 2 …… を透過し、焦点面 Σ 上の直線 L の上に微小スポット 1 1 1, 1 1 2 …… 1 1 M を結ぶ。A O 偏光器¹²の周波数を変えると図 4 の点線で示すようにマイクロレンズに入射する励起光の角度が変化する、直線² L 上の微小スポットの位置が 1 j₂ 1, 1 j₂ 2 …… 1 j₂ M の様に変化する。

~~{0022}~~

マイクロレンズアレー 1 4 の焦点面 Σ 上にできた微小スポットアレー 1 1 1, 1 1 2 …… 1 1 M は図 1 に示すようにレンズ 1 5 と対物レンズ 1 6 により DNA チップ 2 のハイブリダイゼーションされたターゲットに付加した蛍光体を照射し、励起する。このターゲットが付いているガラス面 Σ 1 又は Σ 2 (詳しくは図 3 参照) 上で最小のビーム径となるように対物レンズ 1 6 のフォーカスがなされる。

~~{0023}~~

図 2 は DNA チップ 2 の面構造の詳細を示したものである。縦横の細い線で示した正方形の最小単位 2 0 1, 2 1 1, 2 0 2, 2 1 2 等は検出絵素を表す。図では 5 × 5 の絵素 (太い線で示す) 分がセル 2 0 である。1 つのセルには同一の DNA 情報の断片が植えられている。従ってこのセルには同じ DNA 断片構造を持つターゲットがハイブリダイズされる。

~~{0024}~~

このように 1 つのセルを複数の絵素で分割する理由は 1 つのセル内に異物であるタンパク質等が混入していたとき、このタンパク質に入射した励起光により、大きな強度の蛍光が発生するようなことが生じる。通常このような異物の寸法はせいぜい数 μm であるので、絵素寸法が数 μm であり、セルの寸法が例えば 1 0 μm ならば、1 0 μm のセル内の異物位置が後述するような方法で検出、分離で

ファイル名 = D99007021A1.el

できれば、異物部分以外の情報により蛍光の大きさを正確に求めることが可能になる。

~~{0025}~~

図3はDNAチップの側面図である。この絵ではハイブリダイズされているターゲットがガラス基板の上に裸で乗っている構造になっている。このような場合もあるし、後述するようにガラス基板の間に挟まれている場合もある。いずれにしてもターゲットのある面に微小励起光スポットが集光される。この集光径は図2で示した正方形最小単位である検出の絵素の寸法にほぼ等しい。

~~{0026}~~

AO偏向器の初期の周波数では図1の実線で示す回折光が得られており、このときには図3に示すようにDNAチップに101, 102, 103...の様に励起光スポットアレイがDNAチップ上の絵素201, 202, 203...20Mに照射され、後述するように各絵素の蛍光が検出される。この励起光の照射時間は蛍光減衰時間以上の時間 Δt (数~数百 μs)で、本実施形態例では60 μs である。

~~{0027}~~

60 μs 経過後、AO偏向器の周波数が変われると励起光の回折角が変わり、図1および図4で示すように、マイクロレンズアレイには点線で示す10j₂0の光が入射し、図3のDNAチップには111, 112, 113...11Mの様に励起光スポットアレイが照射され、211, 212, 213...21Mの絵素の蛍光が検出される。このようにしてM個のマルチスポットが絵素ピッチずつずれて順次照射され、j絵素分ずれるとjM絵素分が総て検出されることになる。

~~{0028}~~

次に蛍光検出の実施形態を図1で説明する。レンズ15と対物レンズ16の間にあるビームスプリッタ30は波長分離ビームスプリッタである。本実施形態で用いている励起光源HE-Neレーザの波長は633nmであり、チップ上のターゲットに付加されている蛍光体はCy5である。検出する蛍光の波長は670nm近辺である。

ファイル名 = D99007021A1.el

~~{0029}~~

波長分離ビームスプリッタ30は633nmでは45度入射光をほぼ100%透過し、670nmの蛍光は45度入射でほぼ100%反射である。しかし633nmもごくわずかに反射する。このごくわずかの反射でも、蛍光が非常に微弱であるので問題となる。そこで図1の実施形態では670nmに中心波長特性を持ち、反値幅が約15nmの干渉フィルタ34を蛍光検出系3に挿入し、励起光の漏れをこの干渉フィルタで遮光している。なお34は干渉フィルタに限定されるものではなく、ある波長以上は透過し、以下は遮光するいわゆる色フィルタを用いても良い。また色フィルタと干渉フィルタを組み合わせ用いても良い。以降の実施形態の説明では説明の簡潔のため干渉フィルタのみで説明する。

~~{0030}~~

次にAO偏向器を用いてマルチスポット励起光のDNAチップ上の位置を変化させるときの、検出蛍光像の位置の変化と、固定の検出器で検出するために行う必要のある、前記位置変化の補正について説明する。図1の波長分離ビームスプリッタ30はこの位置変化の補正も行っている。図5は図1の主要な部分を示しており図1と同一番号は同一物を表している。波長分離ビームスプリッタ30は5~10kHzの高い共振周波数特性を持つ piezo 素子301で駆動され、y軸を中心に微小回転する構造になっている。

~~{0031}~~

6A, 6B, 6C, 6D, 6E

図6、図7はこの微小回転の役割を示した図であり、図1と同一番号は同一物を表している。制御回路4からAO偏向器12に入力される偏向信号により、図6(c)のDNAチップ2上のマルチ励起微小スポット1011、1021、……、10M1のそれぞれの位置が1絵素ずつ1012、1022、……、10M2と順次変化させていく。このとき図6(D)に示すように波長分離ビームスプリッタ30が回転しないとすると、DNAチップと共役な位置にある蛍光検出面 Σ_{PH} 上のマルチ蛍光点1211、1221、……、12M1はやはり1絵素ずつ1212、1222、……、12M2へ変化する。

~~{0032}~~

蛍光検出面上の蛍光スポット像1212は、図に示すように、蛍光検出用マイ

ファイル名 = D99007021A1.el

クロレンズアレ-3 2 1により1 2 1 2点が光ファイバ束3 2 2の1本のファイバ端に結像し、ファイバに入射する。1本の光ファイバは光が通る芯3 2 2 1とそれを保護する部分3 2 2 2から成り立っている。光が通る芯の径は、蛍光検出面 Σ_{PH} 上の(マルチ)蛍光点1 2 1 1よりやや大きい。しかし、波長分離ビームスプリッタ3 0が回転しないと、1 2 1 1点がA O偏向器¹²の駆動により1 2 1 2, 1 2 1 3, 1 2 1 4, ...^{(12)6E}と移動し、ファイバ入射端からずれていき、検出できなくなってしまう。そこ高い共振周波数特性を持つピエゾ素子3 0 1で図7に示すように波長分離ビームスプリッタ3 0を微小回転駆動する。

~~{0033}~~

すなわち微小回転しない場合の図6では、蛍光微小スポット像1 2 1 1が異なる場所1 2 1 2, 1 2 1 3, 1 2 1 4に移動したのに対し、微小回転することにより、図7の点線の枠内に示すように Σ_{PH} 上のほぼ同一位置にスポットがくる。

~~{0034}~~
8A-8H

図8は、以上説明したA O偏向器1 2のON-OFFあるいは強度変調信号 S_{A12} 、同じくA O偏向器¹²の偏向信号 S_{B12} 、波長分離ビームスプリッタ3 0を偏向駆動するピエゾ素子3 0 1の駆動信号 S_{30} 、ファイバ3 2を介してk番目の1つのフォトマル3 3で検出する蛍光検出信号 S_{33k} 、この蛍光検出信号の絵素ごとの画像蓄積(積分)信号 S'_{33k} 、およびこの画像蓄積の各絵素毎の最終結果(画像蓄積していき、励起スポット光が次の絵素の励起に移る前の時刻で S'_{33k} をサンプルホールドした値) S''_{33k} について各信号の相対的な時間変化を表している。このグラフの実施例ではマルチスポット励起光をA O偏向器により順次1絵素ずつずらして行き、このようにして1つのスポットを10絵素まで順次ずらしている。

~~{0035}~~

このずらす数は、各絵素の検出のSNを向上させるため2以上必要であり、大きいほどSN向上を図る上で望ましいが、装置の構成部品上の制限等により自ずと上限がある。しかし5以上にすると隣接するスポット励起光による光路途中の異物照射に伴う散乱光、あるいは蛍光の影響等が大幅に少なくなる。

ファイル名 = D99007021A1.el

~~{0036}~~
84-8H

図8に示すようにAO偏向器12の周波数（超音波水晶振動子に与える超音波の周波数、すなわち偏光器の偏向角度）信号 S_{B12} を順次ステップ的に変え、この間この変化に応じて波長分離ビームスプリッタ30を偏向駆動するピエゾ素子301の駆動信号 S_{30} を線形に変化させる。AO偏向器12が超音波の伝播による透明媒体の屈折率のごくわずかな変化により、光を回折させているのに対し、ピエゾ素子301はビームスプリッタ全体を駆動させるため、周波数応答性が異なるため~~早い~~ AO偏向器の信号 S_{B12} はステップ、遅い~~遅い~~ピエゾ素子の駆動信号 S_{30} は線形にしている。

~~{0037}~~

図9はこの2つの信号により蛍光検出面 Σ_{PH} 上できる蛍光スポット像の位置を示した図である。この図の上から下への変化は時間 t の経過を表している。左の2つのグラフは S_{B12} と S_{30} の変化であり、図8ではステップ数が10であったが、この図ではステップ数が5である。図9のグラフの右側にある実線の丸○、3211'、3221'、3231'……は蛍光検出マルチスポット像が図6で説明したようにピエゾ素子による位置補正をおこなわない場合の像の位置ずれを示している。なお、図の右方向（横方向）はスポットアレイの配列方向 x_A を表しており実線の丸○、3212'、3222'、3232'……は隣接する蛍光スポット像の位置ずれを示している。点線の丸○はピエゾ素子により位置補正を行った結果である。

~~{0038}~~

すなわち、AO偏向器でステップ移動し、励起光が停止していても、ピエゾ素子は線形に偏向を駆動しているため励起光が停止している間に蛍光検出面 Σ_{PH} 上~~に~~できる蛍光スポット像の位置は3211₋、3211、3211₊とわずかではあるが動いてしまう（隣の蛍光スポット像の位置では3212₋、3212、3212₊とわずかではあるが動いてしまう）。

~~{0039}~~

励起光がDNAチップ上の次の照射位置にステップ移動し停止している間には、蛍光スポット像の位置は、3221₋、3221、3221₊とわずかではある

ファイル名 = D99007021A1.e1

が動いてしまう（隣の蛍光スポット像の位置では3 2 2 2₋、3 2 2 2₊、3 2 2 2₊とわずかではあるが動いてしまう）。この蛍光スポット像のわずかな動きをカバーして検出するには、~~図9の下~~の図10に示すように蛍光検出受光面（あるいは受光面と共役な面）3 2.0にアレイ方向 x_A に長い長円開口の配列3 2 0 1, 3 2 0 2 …… 3 2 0 Mを設ける。上記のファイバでの検出の場合にはファイバの入射端面がこの長円を含めば良い。

~~{0040}~~

図11は、本発明の実施形態を示す図である。図1と同一番号は同一物もしくは同一機能を有するものを表す。本図では図1の全体装置のうちマルチスポット励起光発生に関わる部分のみを示している。それ以外の構成は基本的には図1と同じである。14'はマルチスポット発生ホログラムである。

~~{0041}~~

図12は、このマルチスポット発生ホログラムの作成方法を示す図である。図12に示すように、マルチスポット励起光の寸法に対応したホール径を有するピンホールアレイ1 j₁ 1'、1 j₁ 2' …… 1 j₁ M' 開口を有するマスク18にレーザー^光を照射し、透過光をフーリエ変換レンズ15でホログラム記録媒体上に集光する。この集光位置に参照光1000を入射角 $\phi = \phi_0$ で若干斜めから重ねて照射し、上記の集光位置にフーリエ変換ホログラムを作る。

~~{0042}~~

光の利用効率を向上するため、位相変調型の記録媒体を用いる。またフーリエ変換面上の中心位置での0次光（空間周波数が0の位置）の強度が桁違いに大きくなりなり、できたホログラムのSN, 回折効率等が悪くなるのを避けるため各開口には互いの位置に無関係なランダムな位相を付加しておく。

~~{0043}~~

このようにして作られたホログラムを図11のDNA検査装置のマルチスポット励起光発生系に用いる。

~~{0044}~~

図11のAO偏向器12に入射したレーザー光は、レンズ系13を通った後、上記の方法で作られたホログラム14'を入射角 ϕ_0 ^で照射する。AO偏向器の駆動

ファイル名 = D99007021A1.el

周波数の中心（偏向角度の中心）ではホログラムに入射するレーザ光の入射角 ϕ は ϕ_0 となり、図 12 の方法でホログラムを作成する時の参照光 1000 のホログラム面に対する入射角度 ϕ_0 に等しくなるようにしておく。このようにしてホログラムにレーザ光を照射すると、図 11 に示すように $1j_1 1$ 、 $1j_1 2 \dots \dots 1j_1 M$ に図 12 のホログラム作製時のピンホールアレーと同一のスポットアレーを再生する。

~~[0045]~~

次に A O 偏向器の周波数を変化させると、ホログラムへの入射角度がわずかに変わるので、マルチスポット再生光の角度もわずかに変わる。この結果、隣の絵素に相当する位置を励起照明することになる。A O 偏向器を順次駆動していけばステップ的に DNA チップを 1 絵素ピッチで順次位置を変えてマルチスポット励起照明することができる。

~~[0046]~~

図 13 は、本発明の DNA 検査装置の実施形態を示す図である。図 1 と同一番号は同一物を表している。本実施形態では、図 1 の実施形態と異なり、同時に 2 次元的な検出を行っている。すなわち、励起照明光は 2 次元的に広い範囲を同時に照明可能な照明系レンズ 13' を通し、波長選択ビームスプリッタ 30' で反射し、2 次元マルチレンズアレー 14' を照明する。14' の 2 次元マイクロレンズアレーは、すでに図 1 ~ 4 を用いて 1 次元のマイクロレンズアレーを説明したと同じ機能を有し、2 次元的なアレー配列のみが異なっている。従って図 14 に示すようにマイクロレンズ 141' の焦点位置に 2 次元微小スポット 1410' を形成する。

~~[0047]~~

本実施形態の場合には、この 1410' の位置を中心にピンホール開口が明けられている。このようにピンホール開口のみを通過する光が DNA チップを照射する。微小マルチスポット光のスポット 1410' の径 d とスポットの配列ピッチ p の比は 2 以上の整数で、5 以上が望ましい。図 13 に示すようにピンホール開口を透過した 2 次元マルチスポット光は高解像レンズ 16' により DNA チップを同時に励起照射する。励起照射される絵素 $2 \times 11 y 11$ 、 $2 \times 12 y 11$

ファイル名 = D99007021A1.el

, $2 \times 11y21$ 、 $2 \times 21y21$ 、……は4絵素とばして等ピッチ間隔である

~~[0048]~~

同時に励起照射された上記絵素から発生する蛍光は上記高解像レンズ16'を通り、マイクロレンズアレイ下面の各ピンホール1410'を通過する。ピンホールを通過した光はマイクロレンズを通過することにより、各マイクロレンズ上面(凸面)の大きさに広がる。このマイクロレンズ上面の蛍光強度が波長選択ビームスプリッタ30'と結像レンズ31'を介して画像蓄積型高感度2次元センサ32'に結像される。本図では干渉フィルタが描かれていないが、波長分離ビームスプリッタ30'と2次元センサ32'の間に干渉フィルタ、または蛍光より長い波長を透過する色フィルタを設置する。

~~[0049]~~

図4及び図14に示した1次元及び2次元のマイクロレンズアレイでは、各マイクロレンズの隣接するマイクロレンズの中間の領域に入射する光は散乱光になりノイズ光となる危険性がある。そこでこの中間の領域を酸化クロム等の材質からなる遮光部で覆うマスキングを行えば(図示せず)このようなノイズを除去することができる。

~~[0050]~~

以上の実施形態、図1, 5, 7, 及び13に用いている波長分離ビームスプリッタ30, 30'と干渉フィルタ34の分光反射特性と分光透過特性をそれぞれ図15及び図16に示す。両方を用いることにより励起光の影響を少なくでき、正確な検出ができるようになる。図で λ は励起光の波長であり、通常スポット照射の単位面積当たりの強度を大きくするためレーザ光を用いるため励起波長バンド幅は狭い。 λ_L は検出しようとする蛍光の中心波長である。

~~[0051]~~

ハイブリダイゼーションしようとするDNA断片に付加される蛍光体には、何種類かの蛍光物質が用いられる。例えば、良く用いられるCy5(Cyanine 5)では、蛍光体の吸収のピーク波長は649nm、蛍光のピーク波長は670nmである。また、更に短波長側では、Cy3(Cyanine 3)では蛍光

ファイル名 = D99007021A1.e1

体の吸収のピーク波長は 550 nm、蛍光のピーク波長は 570 nm である。吸収体の分光吸収特性はバンド幅を有するため、吸収のピーク波長と励起レーザー光の波長は必ずしも一致させる必要はなく、吸収ピーク波長に近いレーザー光が用いられる。

~~{ 0052 }~~

Cy 5 では He-Ne レーザの赤の光 633 nm や波長 635 nm の半導体レーザー光を、Cy 3 では He-Ne レーザの緑の光 544 nm 等を用いる。蛍光のみを取り出す干渉フィルタ、及び波長分離ビームスプリッタは、蛍光のピーク波長に近く、励起光を分離しやすい波長を中心波長に選ぶ。

~~{ 0053 }~~

上述した蛍光検出に際し、励起光を完全に遮光することが特に蛍光が微弱な場合に非常に重要となる。

~~{ 0054 }~~

図 17 は、このような励起光の遮光をより完全に行うための本発明の実施形態図である。即ち、上述の干渉フィルタや波長選択ビームスプリッタのみでは不十分な場合、或いは、蛍光検出光強度を大きくするため、干渉フィルタのバンド半値幅を大きくしようとする場合に実施する。図 17 で図 1 と同一番号は同一物もしくは同一機能を有するものである。

~~{ 0055 }~~

マイクロレンズアレイやホログラムで Σ_f 面上に形成されたマルチスポットアレイ 111, ..., 11M は、レンズ 15 及び対物レンズ 16 により DNA チップ上に励起光として結像される。この際各マルチスポット光が対物レンズの入射瞳 EP_0 の中心にほぼ半径 RNA_{σ}' の広がりで通過する。対物レンズの開口数を NA, 焦点距離を f とすると励起光の DNA チップ上のスポット径 D_s は次式で与えられる。

~~{ 0056 }~~

$$D_s = 2 k_1 f \lambda / RNA_{\sigma}' \quad (\text{但し } k_1 = 0.6)$$

DNA チップ検出の絵素分解能 (絵素ピッチ) を p とすると、この値はほぼ D_s に等しい。 p を $2 \mu m$, 励起光波長 λ を 633 nm とすると、 RNA_{σ}' / f は

ファイル名 = D99007021A1.e1

0.19となる。 RNA_{σ}' / f は $2 \mu m$ のスポットを照射するための照明のNA ($2 \mu m$ スポットを結像するために必要な対物レンズの最低限のNA)でこれをNA' とすると、

$$NA' = \sin(\tan^{-1}(RNA_{\sigma}' / f)) \cong RNA_{\sigma}' / f = 0.19$$

となる。対物レンズ16のNAは微弱な蛍光を検出するため0.7以上0.9以下である。

対物レンズの入射瞳を上記のスポット径で通過した各励起スポット光は、対物レンズによりDNAチップ上に約 $2 \mu m$ の励起スポット光を照射する。この対物レンズは両テレセントリックであるため、DNAチップに垂直に入射した励起光はチップ表面で約4~8%の励起光が正反射し、対物レンズに戻ってくる。この正反射光は波長分離ビームスプリッタにより、励起光は透過されるが、わずかに反射し蛍光検出系3に向かう。

~~[0057]~~

3
蛍光検出系³には干渉フィルタ34があり、励起光は遮光されるが、完全な遮光が難しい。即ち、干渉フィルタのバンド幅を広くして蛍光をできるだけ多く検出しようとする、励起光がわずかに漏れる。そこで蛍光スポット光を蛍光検出面(或いはそれと共役な面)に結像検出するレンズ系31'を図のようにレンズ系311と312で構成し、対物レンズの瞳が311と312の間の位置に結像するようにする。この瞳と共役な位置に空間フィルタ35を配置する。空間フィルタ35は図18に示すような構造を持っている。

~~[0058]~~

レンズ径311による対物レンズ瞳面の空間フィルタ35への結像倍率を1倍とする。空間フィルタは、遮光部353の光軸中心から対物レンズの瞳半径と等しいRNAの半径を有する開口の中心部に、半径 RNA_{σ} の円形の遮光部351を有する。DNAチップで正反射したマルチスポット励起光はこの空間フィルタ上でビーム径 RNA_{σ}' になっている。従って $RNA_{\sigma} > RNA_{\sigma}'$ であれば、正反射光はこの遮光部351で遮光される。

ファイル名 = D99007021A1.e1

~~{0059}~~

一方マルチスポット励起光で励起され発生する蛍光は、ほぼ無指向で対物レンズに入射し、この空間フィルタに入射してくる。遮光部 351 により、蛍光も遮光されるが、遮光される蛍光の空間フィルタ入射蛍光に対する比率は $(NA' / NA)^2$ となり、上記値を入れると 7 ($NA = 0.7$ の時) \sim 4 ($NA = 0.9$ の時) % になり、このロスは無視できる程度である。

~~{0060}~~

このように、検出すべき蛍光の光量を落とさずに不必要な励起光を大幅に低減することができる。空間フィルタを透過した蛍光検出光は、レンズ 34 と干渉フィルタ 34 を通り、検出面であるファイバの入射端に DNA チップのスポット像を結像し、蛍光検出される。

~~{0061}~~

図 19 は、本発明の実施形態を表す図である。励起光を蛍光検出光路に導かないようにする方法を示す。図 1 と同一番号は同一物を表す。励起光路と蛍光検出光路を分岐するビームスプリッタは本実施形態では偏光ビームスプリッタ 30'' を用いている。即ち励起光をこの偏向ビームスプリッタのスプリット面にたいし P 偏光で照射する。DNA チップ表面で反射し戻ってくる励起光は P 偏光を保っているため、偏光ビームスプリッタを通過し、蛍光検出光路には入らない。他方発生する蛍光の偏光は励起光とはずれているため偏光ビームスプリッタ 30'' で S 偏光は反射し蛍光検出光路に導かれる。このようにすれば励起光の蛍光検出光路への入射を防ぐことができる。

~~{0062}~~

図 20 は、本発明の実施形態を示す図であり、蛍光検出を光ファイバとマルチチャンネル光電子増倍管を用いて行うものである。図 1, 5, 7, 17, 及び 19 に示した実施形態における蛍光マルチスポット像の検出具体内容を示している。マルチスポット数が M 以上の数からなるファイバ系 32 の入射端は図 21 に示すように M 個の 1 次元配列したマルチレンズアレイ 321 である。

~~{0063}~~

図 7 で説明したように、蛍光マルチスポット像は、各マイクロレンズによりフ

ファイル名 = D99007021A1.el

ファイバの光を伝搬する芯（コア）に入射される。マルチチャンネル光電子倍增管 33 が図 20 に示すように 2 次元の受光開口配列の場合には、ファイバの出射端が 2 次元配列になるようにする。各出射端から出てきた蛍光は、図 20 の実施形態の場合には結像レンズ 324 により、ファイバ出射端 323 が光電子倍增管 33 の各受光開口 331 に対応して結像するようにする。

~~{0064}~~

図 21 の実施形態の場合には、ファイバの出射端に 2 次元レンズアレイ 324 1 が対応して設置されており、各ファイバから出射した蛍光は各レンズを通り、直接マルチチャンネル光電子倍增管の 2 次元受光開口（光電面）3311 に集光するようにしている。図 20, 21 に示した実施形態では、2 次元のマルチチャンネル光電子倍增管であったが、1 次元のマルチチャンネル光電子倍增管でも、出射端を 1 次元配列にすることにより、同じ方法で実現できる。

~~{0065}~~

図 22 は、本発明の実施形態を示す図である。本実施形態では、励起光として複数の波長を用いている。光源系 11A、11B、及び 11C は、異なる波長 λ_A 、 λ_B 、及び λ_C の励起光源からの光を成形し、ファイバ束に入射させ、出射端にマルチレンズアレイを配列し、出射後のほぼ集光する位置にピンホールアレイを設けている。ピンホールアレイを出射した励起光は、波長分離ビームスプリッタ 30A、30B、30C を通るように構成されている。図 22 に示されているように、11A が蛍光検出の励起光に選ばれている時には、 λ_A の励起光がレンズ 15 を通過して、偏向ミラー 300 で反射され、対物レンズ 16 を通り、DNA チップ 2 をマルチスポット励起照射する。各スポットから発生する蛍光は、対物レンズ 16、偏向ミラー 300、レンズ 15 (31) を通り、波長選択ビームスプリッタ 30A で反射し、干渉フィルタ 34A を通り、図 20 及び 21 で説明したような方法で各スポットの蛍光をマルチチャンネル光電子倍增管検出する。

~~{0066}~~

検出する蛍光が異なるタイプの場合には、制御装置 4' から図示していない駆動機構により実線矢印の方向に光源系全体を移動し、異なる波長 λ_B 、及び λ_C

(50A, B, C; 120A, B, C; 130A, B, C; 30A, B, C; 34A, B, C)

ファイル名 = D99007021A1.el

のいずれかを選択し、この波長で蛍光検出を行う。1つのDNAチップに複数の蛍光を用いている場合には、光源系を順次移動させて、次々に異なる励起光で検出していく。

~~{0067}~~

図26は、上記の複数の蛍光を用いる場合の異なる実施形態である。図22と異なり、複数の励起光を同時に照射し、検査時間の短縮を図ったものである。図26では複数の波長 $\lambda_{A'}$ 、 $\lambda_{B'}$ 、及び $\lambda_{C'}$ が例えば赤、緑、青の3色の光源系11A'、11B'、及び11C'から出射した光は波長選択合成ミラー51、52により、1つの光路に効率よく合成される。即ち波長選択合成ミラー51は青を透過し、緑を反射する。また波長選択合成ミラー52は赤を透過し、緑と青を反射する。

~~{0068}~~

合成された3色は、ビームスプリッタ30'を透過し、レンズ15、偏向ミラー300、対物レンズ16を通過し、DNAチップ上に3色同時にスポット励起照明する。各波長でそれぞれの蛍光体が励起され、それぞれの蛍光色で発光するが、概ね、励起光よりわずかに長い波長の蛍光であるので、これら3波長の光で励起された3波長の蛍光を、波長分離ビームスプリッタ53、54で波長分離することができる。即ち波長分離ビームスプリッタ53は青の蛍光を反射し、緑と赤を透過し、波長分離ビームスプリッタ54は緑を反射し、赤を透過する。

~~{0069}~~

このように各3色に分離された光路に、それぞれの蛍光のみを純度高く透過させる干渉フィルタ34C、34B、及び34Aを配置し、各蛍光の微小スポット像を上述の方法によりファイバを介して、マルチチャンネル光電子増倍管33C'、33B'、及び33A'で同時に検出する。

~~{0070}~~

図22及び図26の実施形態では、励起マルチスポット光のアレイ方向の走査を偏向ミラー300で行う。偏向ミラーはピエゾ駆動方式もしくはガルバノミラータイプのものを用いる。この場合、図1で説明した実施形態とは異なり、マルチスポットはステップ移動ではなく、連続(線形)走査になる。DNAチップ上

ファイル名 = D99007021A1.e1

でのマルチスポットは走査になるが、検出光路にも同じ（同一の）偏向ミラーが使われているため、蛍光検出のファイバー端には動かないマルチスポットが結像している。このため偏向ミラーの偏向角に基づき画素番地が決定されることになる。

~~10071~~

このような画素番地と偏向角の関係に基づき、マルチチャンネル光電子倍增管から並列的に得られる複数の蛍光検出信号は制御回路^{装置}4'（図22）や4''（図26）により整理され、保存される。勿論このようなデータ処理には予め計測、検出の条件を入力しておく必要があり、これら入力情報は端末41'から入力されるか、或いは上位のコンピュータ40からこれら情報が入力され、必要に応じて、計測・検査結果のデータがコンピュータに送られる。

~~10072~~

図26の実施形態で、複数の波長の異なる励起光を同時に照射する例を説明したが、例えば、複数の励起光とそれぞれの狙っている蛍光の波長帯が重複しているような場合には、重複するものについては光源に近いところにある図示しないシャッタを用いたり、光源そのもののON-OFFにより、時間をずらして蛍光検出することによりこのような問題を回避する。

~~10073~~

図23は、励起光源に複数のほぼ同一波長の半導体レーザ111A2, 111A2……を用いた実施形態である。半導体レーザは容積が小さく比較的高出力で、安価であるため、図に示すように多数の半導体レーザを用いて、マルチスポット光源を作ることにより、強いマルチスポット励起光をDNAチップに照射することが可能になり、高速検出が実現する。各半導体レーザから出射した光をレンズ112A1、112A2……によりファイバ120A1, 120A2……の入射端に取り込む。

~~10074~~

出射端から出射するレーザ光を図24に示すようにマイクロレンズアレイを介してピンホール配列111, 112……に集光させ、この透過光をマルチスポット励起光として用いる。

ファイル名 = D99007021A1.el

~~[0075]~~

励起光として半導体レーザを用いることができない場合には、半導体レーザ励起の高出力固体レーザや、高出力ガスレーザを用いる。このようなレーザ光源では出射ビームを図25に示すような方法で分割して用いると、ほぼ等しい強度で、ほぼ等しいビーム形状を有するマルチスポット励起光を形成することが可能になる。

~~[0076]~~

即ち、レーザ光源111A'から出射したビームをマルチ分割ビームスプリッタ1110A'、1120A'……で分割する。分割する数をkとすると、分割の初段から2段、3段……k段目までのビームスプリットの反射率を r_1 、 r_2 、…… r_j …… r_k とする。 r_k は1であること、各ビームスプリット光は強度が等しいので、 $1 \leq j \leq k$ の任意のjに対し、

$$r_j = 1 / (k - j + 1)$$

を満たすようにすればよい。即ち1110A'ではkが4、即ち4分割であるので、 r_1 は $1/4$ 、 r_2 は $1/3$ 、 r_3 は $1/2$ 、 r_4 は1となる。同様に1120A'は3分割であるので r_1 は $1/3$ 、 r_2 は $1/2$ 、 r_3 は1となる。このように等しいビーム強度で、等しいビーム形状のレーザ光がレンズアレイ112A1'に入射し、ファイバの芯に入射する。

~~[0077]~~

図23の実施形態では、複数の半導体レーザをマルチビームスポット発生光源として用いているが、半導体レーザ以外のガスレーザや第2高調波によるレーザなどを複数用いてマルチスポット励起光を形成することも、入手できるレーザ光のパワーが不足する場合には必要になる。このような場合には図25に示す系を複数用いて、この複数の系から取り出されるファイバ出射端を1次元上或いは2次元上に配列することにより、励起強度の大きいマルチスポット光を得ることができる。

~~[0078]~~

上記の複数の励起光を用いる場合、励起波長によっては半導体レーザ、ガスレーザ及び半導体励起の第2高調波を用いる固体レーザ等各種タイプの異なるレー

ファイル名 = D99007021A1.el

ザを用いる必要が生じる。このような場合に上記の図 23 や図 25 の方法でマルチスポット励起光を形成すればよい。

~~【0079】~~
28

図 27 は本発明の実施形態を示す図であり、励起マルチスポット光が DNA チップに混入した異物からの蛍光や散乱光、或いは検出光学系の異物からの散乱光の影響を除去し、精度の高い蛍光検出を実現するものである。11' は励起光源でファイバを介してピンホール開口アレイ 14' を透過して励起マルチスポット光を作る。マルチスポット光はレンズ 15 と対物レンズ 16 により DNA チップ上に結像する。対物レンズの入射瞳の位置には空間フィルタ 161 がある。

~~【0080】~~

(図 28 参照)

励起マルチスポット光はこの瞳の中心からずれた 163 の位置を通過するように設定されている。即ち各マルチスポット光は図 29、図 30 に示すように対物レンズの光軸から外れた部分を通り、図 30 に斜め斜線で示す I_i の光束となって、DNA チップ 2 に斜め方向 θ_i の入射角で照射する。この照射収束光の収束角 θ_I は、先にスポット径と NA' の関係を説明したように、 $\sin(NA') = \theta_I / 2$ となる。

~~【0081】~~

また、DNA チップで正反射した励起光は、対物レンズを通過し、瞳 161 上で 163 とはレンズ光軸を対称の中心として対称な位置 (図の 162 に相当する位置) を通る。(図 28 参照)

~~【0082】~~

そこで、図 28 に示すように、ここに正反射光を遮光する部材 162 を形成しておけば、励起正反射光はこの 162 で遮光される。このように瞳の中心から外れた位置を励起光の主光線の光路にし、この主光線の入射角 θ_i に対し、 $\theta_i > \theta_I / 2$ の条件を満たすようにすれば、励起光を瞳上で遮ることなく、励起正反射光を瞳上で遮光することができる。本実施形態は図 17 の実施形態で説明した励起光による雑音除去の効果を有することは言うまでもない。

~~【0083】~~

この効果に加え、図 27 の実施形態では、DNA チップ上或いは中に混入して

ファイル名 = D99007021A1.e1

いる異物の影響を、以下の様にして取る。即ち、DNAサンプル作成時に混入した各種蛋白質等の異物があると、これに励起光が照射すると、このような異物の寸法が数 μm と小さいため、励起光が散乱する。また上記の有機物の様な異物の場合には異物から強い蛍光が発せられ、検出すべきDNAに付加している蛍光体より強い蛍光となる。

~~[0084]~~ $(= \sin \theta_{LTS})$

図30に示すように、散乱励起光は~~点で塗った~~対物レンズのNAで決まる領域L+Sを透過し、対物レンズを通過後、空間フィルタの遮光部163以外の部分を通り、蛍光検出系に漏れてくる。この漏れを波長分離ビームスプリッタ61で励起光だけ取り出し、像検出する。波長分離ビームスプリッタは蛍光を透過し、励起光を反射する。波長分離ビームスプリッタの挿入位置は図29では波長分離ビームスプリッタ30'の後ろの光路にあるが、前に置いても良い。このようにすることにより、異物で散乱した励起光が蛍光の画像がマルチチャンネル光電子増倍管等の検出器33'で撮られるのと同様に、励起光散乱像S100が検出器62により画像として検出される。

点線で囲まれた

(図29参照)

~~[0085]~~

31A, 31B

図31は、このように検出された蛍光像信号 D_L と励起光像信号 D_S を、各絵素毎の信号レベルで表している。即ち1, 2, ..., 25は検出絵素番地を表し、(1)、(2)、(3)、(4)、(5)は同じDNA配列が付いているセルの番地である。即ち例えば1, 2, 3, 4, 5番地の絵素は(1)のセルに属する。実際にはセル内の絵素は2次元であり、例えば 5×5 絵素あるが、図を用いた説明を分かりやすくするため1次元にしている。異物がある絵素にかかっていればその絵素の散乱励起光は閾値 D_{ST} を越える。

~~[0086]~~

図31で、励起光像信号 D_S は絵素番地9, 10, 11及び16, 17, 18, 19, 20で閾値 D_{ST} を越えている。従って、蛍光像検出信号 D_L の該当する番地の情報は異物の影響を強く受けているため、この番地の情報を除去して各セルの蛍光の平均値を求める。すなわち、セル番号(2)については絵素9, 10番地の情報は用いないで残りの6, 7, 8番地の情報のみを用いて平均値を算

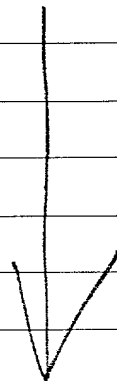
出する。同様にセル(3)については13, 14, 15のみの情報を用いて平均値を求める。セル(4)は総ての絵素が異物で散乱しているためこのセルは無効とする。このようにして図3 1^Cの下グラフに示すようにセル内の平均強度を求めることにより、異物の影響を大幅に低減し、正確な蛍光検出ができるようになった。

~~{0.087}~~

なお、図27から30を用いて説明した異物の影響を除去する実施形態の光学系では、励起光が対物レンズを通してDNAチップを照明する光学系になっているが、対物レンズを通らずに対物レンズとDNAチップの間から斜めに照射し、散乱光を検出する構成でも良い。この場合には、正反射光が対物レンズに入射しないため、空間フィルタ(161に相当する)が不要になる。

~~{0.088}~~

図32は、本発明の実施形態を示す図である。1は既に詳細な実施形態を説明したマルチスポット励起光照射系であり、3は同じく詳細を説明したマルチスポット励起光で発生した蛍光を検出する蛍光検出系である。DNAチップ2の上にハイブリダイゼーションされているDNAに付いている蛍光に数 μm の微小スポット励起光を対物レンズ16により照射するには、スポットサイズが一定に保たれるよう対物レンズと蛍光面を焦点深度内の一定の間隔に常時維持していなければならない。このため剛性上対物レンズ16と構造的に一体になった焦点検出系7を用いる。焦点検出系7は斜めビームスポット照射系71とスポット位置検出系72から構成されている。斜めビームスポット照射系71はDNAチップ上の蛍光面に斜めから微小スポットを照射する。



スポットを照射して対物レンズ^{Y6}と蛍光面
の間隔を検出し、DNAチップ²を搭載
しているステージ80がx, y方向に駆動
モータ83(84)により駆動しても常に
上記一定の間隔が維持される
ように対物レンズ^{Y6}上下駆動機構73
により検出信号を基に対物レンズ16を
z方向に駆動制御する。

82はx, yステージの測長器である。

~~[0088]~~

図33はDNAチップの断面構造の1例である。この実施形態図において蛍光面は $\Sigma 2$ 面である。即ちガラス等の平坦な基板23上に蛍光面 $\Sigma 2$ があり、この面とガラス基板21上の面 $\Sigma 1$ の間には蛍光が付加された被検査DNAを含んだ液体を流し、ハイブリダイゼーションさせるための間隙22がある。DNA検査の段階ではこの間隙に液体を満たしておく。しかし場合によってはこの間隙を空にしておくこともある。また蛍光面を $\Sigma 1$ にし、基板23は不透明な材質や光を吸

ファイル名 = D99007021A1.e1

収する材料にしておくこともある。

~~10090~~

斜めスポット照射系 71 から蛍光面で収束するように斜めから照射される光ビーム f_0 は上部基板 21 の上面 $\Sigma 3$ と下面 $\Sigma 1$ 、及び下部基板 23 の上面 $\Sigma 2$ と下面 $\Sigma 4$ の 4 面で正反射する。斜め照射ビーム f_0 の主光線 f_{0M} が正反射した光線 l_3, l_1, l_2, l_4 は、結像レンズ 721 によりポジションセンサ 722 の受光面に等しい面上の P_3, P_1, P_2 、及び P_4 の位置にそれぞれ像を結ぶ。蛍光面の位置は予め決まっているので、各面 $\Sigma 3, \Sigma 1, \Sigma 2$ と $\Sigma 4$ があ
か 5 の反射光 f_2 による
る程度離れていれば、検出したい面（この実施形態図では $\Sigma 2$ ）のスポット像位置のみを受光し、それ以外のスポット像は受光開口外となるように受光ポジションセンサ 722 の寸法と、レンズ 721 の結像倍率を決めておけば、所望の検出面のみの高さ検出ができる。

~~10091~~

即ち、この実施形態では、 $\Sigma 2$ 面からの正反射光のみをポジションセンサで捕らえ、ポジションセンサ上のスポット位置即ち $\Sigma 2$ 面の高さ位置を検出することができる。装置 制御回路 4 により、この検出情報に基づき対物レンズ、及び対物レンズと一体になった焦点検出系 7 を、駆動装置 73 により上下に微動することにより常時合焦点状態で蛍光検出することが可能になる。

~~10092~~

図 33 の斜め入射フォーカス検出光の入射角がブリュースター角に近いと、P 偏向で入射させると表面での反射が非常に小さくなり、検出困難になる。従って S 偏向を用いる。S 偏向にするとどのような入射角でも P 偏向に比べ表面での反射率が高くなり有利である。

~~10093~~

図 34 は本発明の実施形態図であり、対物レンズ 16 を通して焦点検出するものである。ファイバ 74 で図示しない近赤外半導体レーザ光源から導かれてきたレーザ光はファイバ出射後ビームスプリッタ 76 を通りレンズ 77、波長分離ビームスプリッタ 300、対物レンズ 16 を通り、DNA チップ 2 の蛍光面に斜めから集光照射する。この照射光の入射角度 θ は対物レンズの開口 NA に相当す

出願書類

ファイル名 = D9900702141.e1

の像ができるので、この像の位置がポジションセンサ73'により検出され、この検出位置から

DNAチップ2の面の高さが求められる。

ポジションセンサ73'上の基準点に像が来るとして

る ($\sin \theta = NA \approx 0.8$ よりやや小さい入射角) 大きさである。正反射した光は再び対物レンズを通り、ポジションセンサ73'上にチップ上の集光点に~~対応~~^{DNA}する。このようにすれば、図33の実施形態同様にして、チップの蛍光面のフォーカス位置を検出できる。本実施形態のように焦点検出に用いる光として、検出蛍光より波長の長い光を用いれば蛍光体を励起することなく、即ち、検出雑音を発生することなく、正確に焦点検出できる。

対物レンズ16を上下動かせる。

~~{0094}~~

なお図34の波長分離ビームスプリッタ300"は近赤外光を透過し、蛍光検出に用いる励起光及び蛍光は反射する。1次元励起光照射光学系1で形成された1次元励起光スポットアレイがレンズ15、波長選択ビームスプリッタ300"及び対物レンズ16を介してDNAチップ2の蛍光面に照射される。発生した蛍光は蛍光検出光学系3により検出される。励起光スポットアレイ照射位置のアレイ方向の移動は波長選択ビームスプリッタを微回転することにより行う。

~~{0095}~~

300"

以上、実施形態の各例を用いて説明したDNAチップの蛍光検出をDNAチップの全セルに亘り行う方法を、以下に図35から40を用いて説明する。

~~{0096}~~

図35はDNAチップの全体の構造を表している。204はDNAチップを実装している全体ケースである。DNAチップはこのケースにある窓200の内側のガラス基板であり、ケース204に固定されている。窓内側の領域202に蛍光物体を添付したDNA断片がハイブリダイゼーションされている。この202の領域の外で窓200の内側に、位置決め用のアライメントマーク201が描画されている。

~~{0097}~~

図2で説明した $N \times N$ (図5では 5×5) の絵素 (太い線で示す) 分が同一のDNA情報の断片が植えられている (プロービングされている) セル20と、このアライメントマーク201の相対的な位置が10分の数 μm の精度で設計、製作されている。

ファイル名 = D99007021A1.el

~~{0098}~~

DNAチップを検査装置に搭載し、既にその実施形態を説明したDNA検査装置内に実装している(図示せず)アライメント検出光学系で少なくとも2つのアライメントマーク201の位置をマーク位置検出2次元CCD等でCCD上の位置として検出する。またこのマーク検出を行ったときのDNAチップの位置は、例えば図32に示すように、DNAチップが搭載されているチャックに設置されているx及びy方向の位置検出用測長器81及び82で検出する。

~~{0000}~~

上記のCCD検出光学系の光軸と、前述の各種蛍光検出光学系における検出光軸との間隔は一定であるので、この間隔と、上記CCDのアライメントマーク検出位置と、測長器の検出位置から、DNAチップの各セルを更に細かくセル内を分割した絵素を正しい位置で検出することが可能になる。この際、2つ以上のアライメントマークの位置検出でDNAチップが回転していることが分かったなら、図示しない回転機構でこの回転を補正する。なお、この回転補正後の正しい位置検出は必要に応じて行う。またこの回転の補正を行わなくても回転量が小さければこの回転量を上記方法で検出し、この回転検出量に基づきxy座標を補正していても良い。また上記のマルチスポット光の方を光学系の微小回転により補正して検出することも可能である。

~~{0100}~~

以上説明したように、DNAチップ上のセル内の絵素を正確な位置決め精度で検出することが、アライメントマーク検出と、DNAチャックの測長によりできるので、以下に示す方法でチップ内の全絵素を順次光速に限無く蛍光検出することができる。図35の2AはM個のマルチスポットアレイ励起光を照射し、スポットアレイ方向にN絵素分順次走査し、元の操作位置に戻るという動作を繰り返すと共に、チャックをy方向に走査することにより、チャックの1走査で検出される領域を表す。即ち、図36に示すようDNAチップ上の絵素2A101, 2A102, ..., 2A10Mが先ず同時に励起照明され、次に前述の方法により1絵素ピッチΔP分マルチスポットが移動し、これを順次続ける。

ファイル名 = D99007021A1.e1

~~{0101}~~

このようにして $N(k)$ 絵素分移動すれば、合計 $MN(k)$ 絵素分、即ち $NM \Delta P$ の幅に亘り、1次元アレイ状に検出される。 $N(k)$ 絵素分の走査が終われば、マルチスポットアレイを初めの位置に戻す。この間DNAチップは図39の y_{st} の時間 t_0 から t_1 の間のように y 方向に1絵素分移動しているので、上記の動作を y 方向の絵素数分時間 t_0 から t_1 の間繰り返せば、領域2Aの全絵素に亘る蛍光検出が終了する。

~~{0102}~~

上記の動作を図1の実施形態のDNA検査装置で行う場合、AO偏光器によるマルチスポット励起光の駆動信号、或いはスポットの移動位置は図38の S_{px} に示すように変化する。更に詳細に見れば図8の S_{B12} のようにステップ移動している。また波長選択ビームスプリッタの偏向信号も図38の S_{px} 同様に変化させる。時間 t_0 から t_1 までこのような変化を繰り返せば、領域2Aの全域を検出できる。

~~{0103}~~

領域2Aの下の端まで検出されると(時間 t_1) 図40の x_{st} に示すようにDNAチップのチャックを x 方向に $NM \Delta P$ だけステップ移動する。ステップ移動後、図39の時間 t_1 後の y_{st} に示すようにチャックを y の逆方向に走査する。これと同時に図38の時間 t_1 後の S_{px} ようにAO偏光器12及び波長選択偏向ビームスプリッタ30の偏向信号を領域2A検出時(時間 $t_0 \sim t_1$) とは逆方向に走査する。このようにすれば図37に示すように領域2Bを領域2Aの検出に引き続き継続的に検出できる。以上の動作をDNAチップの y 方向について一方向と+方向に交互に繰り返せばDNAチップの2Aから2Jまで全チップを高速に検出することができる。

~~{0104}~~

本実施形態でDNAチップを総て検出するのに要する時間を説明する。チップ内のセル数 L 、各セルを $N \times N$ 分割することにより、異物等の影響を回避することにする。このようにするとチップ内の全検出絵素数は LN^2 になる。マルチスポット励起光の同時照射スポット数を M とするとし、同時にマルチスポットで検

ファイル名 = D99007021A1.e1

出する時間を Δt とすると、スポットの移動や、チャックの x 方向の移動による時間が蛍光検出する時間に比べ短いとして無視すると、全蛍光検出時間 T は次式で与えられる。

~~(0105)~~

$$T = L N^2 \Delta t / M$$
$$= L N^2 / (M / \Delta t)$$

マルチスポットのスキャン数 k に対し、波長分離ビームスプリッタ 30 の応答時間 t_p は $k \Delta t$ 以上である必要がある。また光源のパワーは $\beta M / \Delta t$ 以上必要である。また励起マルチスポット光の間隔は 5 以上が SN の上で望ましい。

~~(0106)~~

蛍光検出に用いる光電子倍增管の量子効率、蛍光波長が長い 670 nm では $5 \sim 10 \%$ と低くなる。また、励起に用いるレーザ光の出力の限界もある。このような条件を考慮し、できるだけ高速に検出するには、例えば $k (= N) = 10$ 、 $M = 50$ 、 $\Delta t = 50 \mu s$ となり、セル数 $L = 1000 \times 1000$ 、セル内分割画素数 $N = 5$ として、 $T = 25 \text{ s}$ となる。即ち $L N^2 / (6 \times 10^5)$ 秒以下の条件を満たす。ちなみに上記の L と N の値をこの条件に入れば 42 秒になり、蛍光検出以外のサンプルチップの装着脱、検査条件の入力、結果の出力を含めて 1 分以内に検出するという条件を満足する。

~~(0107)~~

1 分で検出可能になれば、多くの検体を検査する場合効果を発揮する。例えば従来 5 分かかっていた検査が 1 分で済むため、前処理に少々時間がかかっても、検体数が百近くになると、前処理が通常多数の検体に対し平行してできるようにするため、5, 6 時間の時間短縮が図れる。

~~(0108)~~

本発明によりこのような高速・高精度の検出が可能になるのはマルチスポットを同時に励起光に用いているためであり、しかも各スポットの励起光による蛍光検出に際し他の励起スポット光の影響を極力受けないようにスポット間隔を開けて検出しているからである。

41A, 41B, 41C, 41D

図1は、本発明によるマルチスポット光を得る方法及びその手段の実施形態を示す図である。

~~{0029}~~

1つ又は複数のレーザ光源より出射したほぼ平行光であるレーザビームは、後述の方法により数mmピッチの互いに平行な同一方向に向かう複数（図では偶数） $N/2$ 本のレーザビーム81となり、 $N/2$ 個のビーム2倍化プリズム411, 412等により N 個のレーザビームになる。 ^{$N/4$ 整数。}ビーム2倍化プリズムは、図1 41Bに拡大斜視図が示されているように（但し、図1の（a）と（b）とでは、ビーム2倍化プリズム411と412との配置は、必ずしも1対1に対応してい

U

ファイル名 = D00000201A1.e1

~~ない。~~、出射面に対しほぼ 45 度になる断面を有する三角形とこの斜面に接触しこの斜面と平行な全反射面を有する平行四辺形の断面を持っている。

~~{ 0 0 3 0 }~~

平行四辺形の一辺に入射した光は三角形の斜面のビームスプリット面ではほぼ 50 % は反射し、残りのほぼ 50 % は透過する。透過した光はそのまま三角形のプリズムを抜け、反射した光は平行四辺形の他の面で全反射し、平行四辺形のプリズムを抜ける。このように三角形及び平行四辺形のプリズムを抜けた光は互いに平行で強度はほぼ等しい。又両光の間隔は P となる。マルチビームの間隔は この結果、ビーム間隔が $2P$ であるレーザビーム 81 の半分の ~~ビーム~~ 間隔 P になっている。

~~{ 0 0 3 1 }~~

このようなビーム 2 倍化プリズムが ~~$N/2$ 個~~、ピッチ $2P$ で $N/2$ 個 配列したビーム 2 倍化プリズムアレイ 4 により、レーザビーム 81 はピッチが P で、ほぼ同一方向に向かい、隣同士が近接している複数 N のレーザビーム 8 となる。この複数 N のレーザビームを後述する偏光素子 11 に入射させることにより、ほぼ同一方向に向かい、隣同士が近接している複数 $2N$ のレーザビームにする。

~~{ 0 0 3 2 }~~

図 42 に示すように、偏光素子 11 は偏光ビームスプリット面 110 に平行で、この偏光ビームスプリット面 110 からそれぞれ $L1$ 及び $L2$ の距離にある全反射面 1101 と 1102 を有する透明なプリズム 111 と 112 からなる第 1 のマルチスポット光 2 倍化プリズムで構成されている。偏光素子 11 の N 本のビームの入射面には図 $49A-49D$ に拡大図が、図 42 に断面拡大図が示されているような球面平凸レンズを短冊状に切断した 21 , 22 の様な短冊状凸レンズが N 個各 N 本の平行ビームの位置に対応して配置されている。この短冊状凸レンズのアレイ 20 を透過したビームは図 42 に示すようにそれぞれ収束光となり、互いに平行に偏光ビームスプリット面に入射する。

~~{ 0 0 3 3 }~~

各ビームは円偏光又はビームスプリット入射面に 45 度の直線偏光であるので、図 42 に示すように入射光 82 の S 偏光成分はこの面で反射し、 P 偏光成分は透過する。図 42 に示すように反射した収束光 822 はプリズム 111 を透過し、ビ

ファイル名 = D00000201A1.e1

ームスプリット面 110^{\vee} に平行な面である 1101 面に 45 度の入射角で入射する。 1101 面で全反射した収束ビーム $822'$ は S 偏光であるため再びビームスプリット面 110^{\vee} で反射する。反射した収束ビーム $822''$ はプリズム 111^{\vee} を透過し、抜ける。

他方 P 偏光成分はビームスプリット面 110^{\vee} を透過した収束ビーム 821 は、プリズム 112^{\vee} を透過し、ビームスプリット面 110^{\vee} に平行な面である 1102 面に 45 度の入射角で入射する。反射光は全反射収束ビーム $821'$ となりし、再びビームスプリット面 110^{\vee} に入射する。入射光は P 偏光であるためほぼ 100% 透過し、この透過光 $821''$ はプリズム 111^{\vee} を透過し、抜ける。

~~{0034}~~

プリズム 111^{\vee} と 112^{\vee} の全反射面 1101 と 1102 はビームスプリット面からそれぞれ $L1$ 及び $L2$ の距離にある。 $L1$ 及び $L2$ の値は $\sqrt{2}$ ($L2 - L1$) が N 本の平行ビーム 8 のピッチ P の半分である $P/2$ である。従ってビームスプリット面で分離した光が ~~近呼応素子~~ ^{偏光} を抜けるときには、2つの光が $P/2$ だけシフトする。この結果偏光素子 11^{\vee} に入射したピッチ P の N 個の収束ビームはピッチが $P/2$ で $2N$ 本の収束ビームとなって偏光素子 11^{\vee} を抜ける。

~~{0035}~~

偏光素子 11^{\vee} のプリズム 111^{\vee} の出射面には図 ⁴³ ~~3~~ に示す直径が d のピンホール開口 211^{\vee} がピッチ $P/2$ で $2N$ 個配列したピンホールアレイマスク 2 があり、収束光はこのピンホールを通過する。 $2N$ 個のピンホール開口以外の部分は光を遮光するので、収束光以外の雑音となる迷光はこのピンホールアレイマスク 2 により遮光される。この結果ピンホールアレイマスクを透過した光はピンホール部のみからスポットアレイ光が発する。

~~{0036}~~

ピンホールアレイ 2^{\vee} を透過した光は隣接スポット毎に P と S の直線偏光になっている。ピンホールアレイ 2^{\vee} の直後には $1/4$ 波長板 ³ ~~3~~ が配置されている。この $1/4$ 波長板はその光学軸が P 及び S の偏光方向に対し 45 度になるように設定されている。従って $1/4$ 波長板 ³ ~~3~~ を透過する P と S 偏光の光はそれぞれ右及び左回りの円偏光になる。

ファイル名 = D00000201A1.e1

~~10037~~

1 / 4 波長板 3^e を通過した 2 N 個の平行な円偏光のビームは偏光素子 1 2^e に入射する。偏光素子 1 2^e は上述の偏光素子 1 1^e とほぼ同じ構造の偏光ビームスプリッタである。即ちビームスプリット面 1 2 0^e で P 偏光を透過、S 偏光を反射する。またビームスプリット面で反射した後通過するプリズム 1 2 1^e の全反射面 1 2 0 1、及び反射した後通過するプリズム 1 2 2^e の全反射面 1 2 0 2 とビームスプリット面までの距離 L 1' 及び L 2' はその値が $\sqrt{2} (L 2' - L 1') = \pm P / 4$ を満たす。このようにすることにより、プリズム 1 2^e に入射するピッチ P / 2 の 2 N 個の平行ビームはピッチ P / 4 の 4 N 個の互いに平行な発散ビームとなり、プリズム 1 2^e から出射される。

~~10038~~

ピンホールアレイマスクにある 2 N 個のスポットから出射する光は偏光素子 1 2^e により 4 N 個のマルチスポット光がまるでマスク面から出射しているように見える。即ち反射面 1 2 0^e、1 2 0 1、及び 1 2 0 2 による鏡像効果により、偏光素子 1 2^e を透過した側から見れば、4 N 個のマルチスポット光がマスク 2^e の面でき、ここから発散光となって出射してくる。

~~10039~~

一例として N の数を 16、P を 1.6 mm とすると、上記実施形態のマルチスポット光の数は 64 となり、ピッチは 0.4 mm となる。後に詳細を説明するが、この光を無限焦点顕微鏡の対物レンズに結像レンズを介して入射させれば、光学系の倍率を 20 倍とすれば被検査対象の試料上に 2 μm のスポットを 20 μm ピッチで 64 スポット同時に照射することが可能になる。

~~10040~~

上記図 1^e の実施形態では第 2 のビーム 2 倍化プリズムアレイ 4^e には N / 2 個のマルチビームを入射させている。N が 8 の場合、仮にレーザ光源が He - Ne レーザのように大きな出力でなく、照射光として大きな強度が必要な場合、例えば He - Ne レーザを 8 本用意し、1.6 mm ピッチで第 2 のビーム 2 倍化プリズムアレイ 4^e に入射するようにすればよい。また半導体レーザを 8 個使い、それぞれを平行ビームにして、上記の He - Ne 同様に 8 本のビームを構成し、第

ファイル名 = D00000201A1.el

2のビーム2倍化プリズムに入射させればよい。この場合、Pを1.6mmとしたので8個のレーザビームの間隔2Pは3mmとなり、He-Neレーザ光のビーム径1mmに対し大きいと8本のレーザ光源から平行に入射させることが可能である。

~~{0041}~~

このようにして第2のビーム2倍化プリズムによりレーザ光源から出射したビームの径dの4倍、即ち4d以下の間隔Pにした状態でも、偏光素子を用いるマルチスポット光形成手段に入射すればその間隔の1/2にでき、また偏光素子を複数n個用いれば1/2ⁿにできる。このように従来困難であった、ビーム径dの4倍以下のピッチで入射する複数Nのレーザビームを2^{M'}N個でピッチP/2^{M'}のマルチビームにし、マルチスポット光に効率よく形成すること、ができるようになった。

~~{0042}~~

44/ 図4は、本発明によるマルチスポットビーム光を形成するための他の実施形態を示す図であり、1つのレーザ光源を用いて、偏光素子に入射させるN本のマルチビームを形成するものである。例えば、YAGSHGレーザの様に光源の出力が大きい場合には、光源が1個でも十分である。このような場合には、44/ 図4に示す様に、44/ 図4の4/e/で示した第2のビーム2倍化プリズムの他に、このプリズムの寸法の2倍、4倍、及び8倍のものを計n=4段カスケード状に並べる。

~~{0048}~~

即ち、1つの光源から出射した1本のビーム80/e/を8倍の寸法のビーム2倍化プリズム441に入射させ、間隔が8Pの2本のビーム801と802を得る。この2本のビームを4倍の寸法のビーム2倍化プリズム431、432に入射し、4本のピッチ4Pのビーム8011、8012、8021、及び8022を得る。この4本のビームを2倍の寸法のビーム2倍化プリズム421、422、423及び424に入射し、8本のピッチ2Pのビームを得る。これを前述の41B/ 図4/e/に図示した8個のビーム2倍化プリズム411、412、413、414、415、416、417及び418に入射し、16本のピッチPのビームを得る。このようにすれば1本のレーザ光源から出射した1本のビームから1.6m

ファイル名 = D00000201A1.e1

mピッチの16本のビームが得られる。

~~(0044)~~

以上の実施形態で説明した方法により、従来では不可能であった、レーザ光源より出射したレーザビームのエネルギーの70%以上の総エネルギーを有するマルチスポット光を形成することが可能になった。

~~(0045)~~

また更に、光学部品の反射防止コートを施したり、ビーム分離の際の損失が小さくなる、多層コートを施したり、ピンホールアレイへの入射光の位置合わせ等を行うことにより、レーザ光源より出射したレーザビームのエネルギーの90%以上の総エネルギーを有するマルチスポット光を形成することが可能になった。

~~(0046)~~

更に、上記の実施形態で説明した方法により、従来不可能であった~~マルチ~~マルチスポット光の各スポットエネルギーのばらつきを、 $\pm 20\%$ 以内にする 것이可能になった。

また更に、ビーム分離の多層コートの条件出しと、製作のコントロールにより、或いは図^{41A}1(a)の偏光器11と、図^{41C}1(c)に詳細を示した短冊状凸レンズのアレイ²⁰、ピンホールアレイ²、及び波長板³、及び偏光器¹²等の光学部品を互いに隣接するものにつて光学接着剤で接着する。このようにすることにより光学部品の表面で反射し干渉することにより発生するビーム強度のばらつきが大幅に少なくなり、マルチスポット光の各スポットエネルギーのばらつきを $\pm 10\%$ 以内にするマルチスポット光形成が可能になった。

~~(0047)~~

なお、上記実施の形態においては、64又は16のマルチスポット光を形成する場合について説明したが、本発明はこれらに限定されるものではなく、 $N=2$ のとき、即ち8以上のマルチスポット光を得る場合に有効である。

~~(0048)~~

次に、以上に説明したマルチスポット光の形成方法により得られるビームを、蛍光検出に、特に蛍光検出を用いたDNA検査に応用した例を、図⁴⁵9を用いて説明する。

ファイル名 = D00000201A1.e1

~~{0049}~~

図⁴⁵5において、8001, 8002, 8003……はレーザ光源であり、図示していないが合計8本のレーザから構成されている。各レーザ光源から出射したビームは数mmの大きさのミラー8011, 8012, 8013……により約1.6mmのピッチで互いに平行に一方向に向ける。8本のビームは前記した方法により0.4mmピッチで64本のマルチスポット光がマスク面3から出射するように偏光プリズム12から得られる。この64個のマルチスポット光は結像レンズ61を通り、ミラー63、波長選択ビームスプリッタ70を通過して対物レンズ60を介して、DNAチップ5の検査面51に照射される。

~~{0050}~~

DNAチップの表面には、予め所定の位置毎に決められたDNAがプロービングされている。一方生体から精製、増幅して作ったDNAに蛍光体が付加されたターゲットDNAを上記のプローブDNAの上に流すと、プローブDNAとターゲットDNAのそれぞれの塩基配列が対応していればハイブリダイズして、蛍光体の着いたターゲットDNAがプローブDNAに結合する。

ターゲットDNAに付加する蛍光体には種々のものがあるが、本実施形態では蛍光体はHe-Neレーザの633nmの光を吸収し、670nmの蛍光を発する。この蛍光を対物レンズ60で受け、透過光を波長選択ビームスプリッタ70で反射させ検出光学系に導く。波長選択ビームスプリッタ70は633nmを透過し、670nmを反射する多層コートビームスプリッタである。

~~{0051}~~

70で反射した蛍光はミラー71で反射し結像レンズ62を通る。DNAチップ表面の蛍光体に照射した各マルチスポット光から発した蛍光の主光線は結像レンズ62を通過した後互いに平行に進むように、結像レンズ62はテレセントリックな光学系になっている。この結果、蛍光の波長の光を反射する波長分離ビームスプリッタにはどのマルチスポット光から来た蛍光も同一の入射角度で入射する。このためどの励起スポットから発した蛍光にもわずかに含まれている雑音成分である633nmの励起光も殆ど反射させずに透過させることができる。即ち波長分離ビームスプリッタ72には励起光の633nmの光がわずかに来

ファイル名 = D00000201A1.e1

ているがその光は透過され蛍光のみが反射し、検出器 9 1, 9 2 に向かう。

~~10052~~

上記の励起光は、DNAチップで反射し、検出器側に向かうが、発生する蛍光の強度に比べ数桁以上強い光である。このため上記のように波長選択ビームスプリッタ 7 0^eだけでは分離できない特に 7 0^eには励起光のスポットの位置により 7 0^eに入射する角度が異なりどのスポットも励起光を同様に除去することが不可能である。これに比べ、テレセントリックな結像レンズ 6 2^eと検出器 9 1, 9 2 の間に置かれた波長選択ビームスプリッタ 7 2^e及び 7 3^eは上記したようにどのスポット位置からの光も同一入射条件で反射させることができる。このような励起光の除去と干渉フィルタ 7 4^e, 7 5^eによりほぼ完全に励起光を遮光し蛍光のみを検出器に取り込むことができる。

~~10053~~

検出器 9 1, 9 2 はマルチチャンネルフォトマルであり、それぞれ 3 2 個の受光開口を有している。フォトマル 9 1, 9 2 の前にある直角ミラーで 7 6^eこの蛍光のスポット像を 2 つに分離し、ほぼフォトマルの受光開口位置に結像する。フォトマルの受光開口の前にはピンホールアレイがある。このピンホールアレイは DNAチップに照射している 2 μ m 径 2 0 μ m ピッチの励起マルチスポット光が対物レンズと結像レンズの倍率 M で結像する寸法にほぼ等しい開口とピッチを有する。即ち、2 M μ m 径の開口を持ち 2 0 M ピッチを有する。このピッチ 2 0 M はマルチチャンネルフォトマルの受光開口ピッチに等しい。

~~10054~~

このようにすればマルチスポット光アレイで同時照射し、生じる蛍光を共焦点検出していることになり、信号対雑音比の高い蛍光検出ができる。得られた 6 4 個の信号は図示しない回路により増幅され、A D (アナログディジタル) 変換器でディジタル情報に変換され図示しない C P U (処理回路) に送られ、照射位置での蛍光強度のデータが保存される。

~~10055~~

ステージ 5 0 1, 5 0 2 を駆動し、異なる位置における蛍光強度の検出を上記の方法で順次求めて行く。信号対雑音比の大きな蛍光検出を行うため照射スポッ

ファイル名 = D00000201A1.e1

トのピッチは照射スポット径の数倍～数十倍にする。従って検査対象を全面検出するにはx y ステージを駆動しマルチスポット光の配列と直角な方向だけでなく、配列の方向にも駆動して検出する。

~~[0056]~~
46 図46は本発明の実施形態の図である。レーザ光源から来た平行ビーム8は円偏光又は紙面に45度の直線偏光である。複数の平行ビーム8の内の1本のビームは、短冊状凸レンズのアレイ20の内の一つのレンズ21に入射し、収束ビームとなり、方解石等の複屈折材料に入射する。常光の偏光成分はそのまま直進し、異常光の偏光成分は屈折する。この偏光素子の厚さはこの常光と異常光の透過の間隔が複数Nからなる入射ビーム光8の配列ピッチPの半分になるように設定されている。この結果偏光器11e'を透過後2N個の収束ビームがピッチP/2で平行に進む。

~~[0057]~~
各ビームは交互に直線偏光の偏光方向が90度異なっている。この偏光方向に45度の光学軸を持つ1/4波長板もしくは、22.5度の光学軸を持つ1/2波長板3e'を通すことにより円偏光もしくは紙面に対し±45度偏光方向を持つ直線偏光を得る。この2N個のビームを偏光器12e'に入射する。偏光器12e'は厚さが11e'の半分の方解石である。この偏光器12e'を透過すると4N本の集束ビームがピッチP/4で得られる。

~~[0058]~~
この光を先に説明した波長板と同じ波長板3e'を通すことにより円偏光又は紙面に45度傾いている直線偏光となる。このマルチビームのピッチと同一でレンズ21とレンズに入射するビーム径で決まる集光径にほぼ等しい開口径を有するマルチ開口アレイからなる板2e'に入射する。このようにすれば、この開口を透過した光のみからなる雑音の無いマルチスポット光が得られる。

~~[0059]~~
47 図47は、本発明の共焦点検出に用いるマルチスポット光形成方法の実施形態図である。図47と図47A-47Dは、47又は複数のレーザ光源より出射したビームを8本の平行なビームにし、第2のビーム2倍化プリズ

ファイル名 = D00000201A1.e1

ム 4 により 16 本の平行ビームにする。この 16 本の平行ビームを凸レンズアレ
イ 20 により収束ビームにする。

~~[0060]~~

第 1 のマルチスポット光 2 倍化プリズム 11^e と 12^e によりマスク 3^e の開口から
実効的に 64 個のマルチスポット光が出射するようにマルチスポット光 2 倍化プ
リズム 12^e より 64 個のビームが得られる。このマルチスポット光 2 倍化プリ
ズム 12^e の出射面に 1/4 波長板 3^e が貼り付けられており、64 のマルチスポッ
ト光は円偏光で方解石からなる偏光素子 11^e に入射する。この偏光子 11^e、
1/4 波長板 3^e、偏光子 12^e、1/4 波長板 3^e、偏光子 13^e、1/4
波長板 3^e は図 8 で説明したビーム 2 分割方法と同じであり、偏光子 11^e、
12^e 及び 13^e は方解石の厚さが t 、 $1/2 t$ 、 $1/4 t$ と薄くなっている。
またビームが分割されていく方向は y 方向である。従って第 1 のビーム 2 倍化プ
リズム 11^e、12^e によって x 方向に 64 個、方解石のビーム 2 分割法によって y
方向に 8 個のスポット光が発生し、合計 64×8 のスポット光が図 8 に示すよう
に発生する。

~~[0061]~~

図 9 は、上記の 64×8 個のマルチスポット光を用いる共焦点検出方法を示し
ている。図 9 の部品の番号と他の図面の番号が同じものは同一物を表している。
レーザ光源から出射し、8 本のビームを形成する 8 ビーム光学系 800 から 8 本
のビームが図 7 に示す 64×8 マルチスポット光形成光学系 100 に入り上記の
方法により 64×8 個の図 8 に示すマルチスポット光がマスク面 3^e から実効的に
出射している。

~~[0062]~~

このマルチスポット光をハーフミラー 70^e、結像レンズ 61^e 及び対物レン
ズ 60^e により、被測定物 5^e の表面に縮小投影する。投影されたマルチスポット
光は被測定面で反射し、対物レンズ 60^e、結像レンズ 61^e、ハーフミラー 70^e
を透過し、検出器 90^e の撮像面の直前に配置された 64×8 個のピンホール
マスク 901^e 面上に結像し、このピンホールを透過した光は検出器の撮像面
に至る。もし被測定物の表面が投影されたマルチスポット光の結像面と一致して

ファイル名 = D00000201A1.e1

いれば、ピンホールマスクのピンホールに反射光が結像し、強い検出値が得られる。一致していなければピンホールマスク 9 0 1' のピンホールには焦点が外れた、広がった光となるため、ピンホール透過光の強度は小さくなる。従って、図 49 に示す z ステージ 5 0 3' により、被測定物を上下方向に動かしては、上記の検出をしていけば、各スポットの位置における高さを各位置での検出最大強度が得られる z 値から求めることができる。

~~(0 0 6 3)~~

上に説明した図 49 の共焦点検出法では被測定物を x y 方向に固定していれば、例えば被測定面上のスポット径が $1 \mu\text{m}$ でスポット間隔が $8 \mu\text{m}$ であれば、 $8 \mu\text{m}$ 間隔の 64×8 点の情報しか得られない。そこで x y ステージ 5 0 1'、5 0 2' を移動させ順次他の位置の共焦点像を検出していく必要がある。図 50 は本発明の実施形態を表す図であり、この 2 次元的な共焦点像を得る方法を示している。図 49 の x y ステージの駆動方向 x'、y' と被測定物体に投影するマルチスポット光の配列方向を図 50 に示すようにわずかにずらしておく。 64×8 のマルチスポット光の場合にはこの 2 つの方向のなす角 θ を $\tan \theta$ が $1/8$ になるようにしておく。このようにすれば y' 方向にステージを走査するとスポット 0 1 1 と 0 2 1 の間の抜けた位置をスポット 0 1 2, 0 1 3 …… 0 1 8 の 7 つのスポットが照射することになり、 $1 \mu\text{m}$ のスポットが $1 \mu\text{m}$ おきに全面走査されることになる。

~~(0 0 8 4)~~

上記の方法を用いると、被測定物体に光強度の大きいマルチスポット光が照射されるため、短時間で 64×8 のスポット位置を検出することが可能になる。そこで試料を y ステージにより y' 方向に高速に 1 走査し、走査後 z 方向にわずかに動かし、再び走査する動作を繰り返すことにより、順次高速に各高さの共焦点信号を検出していく。このようにして各高さ z で得られた各点の 2 次元強度データから各点で最も強度の大きい高さを求めることにより、高速の共焦点検出法による高さ計測が可能になる。なお、上記の走査の幅をマルチスポット光のピッチ p の k 倍とすると、x 方向の画素数 $64 \times 8 = 512$ 、y 方向の画素数 $8k$ の 2 次元高さ情報が得られる。

次に、
マルチスポットを形成する他の実施例に

ついて説明する。

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態を説明する。ここでは、DNAプローブアレイを例にとり、DNAプローブアレイの多数の微小反応領域に固定化されたDNAプローブとハイブリダイズして捕捉された目的DNAを標識している蛍光標識物から発せられる蛍光強度分布を計測する装置、方法について説明する。ただし、本発明はDNAに限らず、蛍光体で標識されたRNA、オリゴヌクレオチド、蛋白質など他の生体試料の検査分析にも同様に適用できるのは勿論である。

~~【0015】~~

測定するためのDNAプローブアレイは、例えば以下に示すようにして作成する。まず、洗浄したガラス基板（スライドガラスなど）をシランカップリング剤

ファイル名 = A00011581A1.e1

(アミノプロビルトリエトキシシラン) で処理して、表面にアミノ基を導入する。ついで、アルデヒド基を導入したオリゴヌクレオチドを微小領域に滴下して反応させて、オリゴヌクレオチドをガラス基板に固定化する。検査対象の検体として、蛍光標識DNAを別途用意し、これを前記基板のオリゴヌクレオチドを固定した領域にスポットし、ハイブリダイズさせて基板上に捕捉し、測定すべきアレイを用意する。なお、ガラス基板へのオリゴヌクレオチドの固定化は、ポリリジンなどのポリ陽イオンでスライドガラスを表面処理し、DNAの荷電とで静電結合させても良いし、さらには、フォトリソグラフィ技術と固相合成技術を使ってガラス基板上に直接オリゴヌクレオチドを合成させても良い。DNAプローブアレイは、これらに限らず周知の種々の方法で作成することができ、同様に測定可能である。

~~(0016)~~

図51は、本発明による蛍光標識物の分布計測装置（DNAプローブアレイ測定装置）の一例の全体構成を示す模式図である。装置はDNAプローブアレイ測定装置本体1と、データ処理・制御ユニット19及びモニタ21から構成される。基板（DNAプローブアレイ）2はXYZ駆動ユニット20の上に固定する。レーザーなどの光源10からの光はマルチ光源分配ユニット11を通すことで、一直線上に均等に配置した複数の光（100a, 100b, ...）として出射される。これらの光はレンズ12によりコリメートされ、ダイクロイックミラー13で下方に反射され、対物レンズ14で集光され、基板2面に励起スポット（101a, 101b, ...）を形成する。図では紙面の関係上、光及び励起スポットを2つのみ表示したが、実際には64個の励起スポットを形成する。励起スポットの数は、16, 32, 64, ...個とより多く形成するほうが高感度、高速化するのに有効である。つまり、全測定時間が同じ時、個々の励起スポット当たりの照射時間はスポット数が多いほど長くすることができ、感度を向上させることができる。また、個々の励起スポット当たりの照射時間が同じであれば、スポット数が多いほど全測定時間を短縮することができ、この場合、64倍高速化が可能になる。

~~(0017)~~

ファイル名 = A00011581A1.e1

基板¹2⁺上の励起スポットから生じる発光（蛍光、散乱光、反射光）は再び対物レンズ1⁺4⁺で集められ、ダイクロイックミラー1⁺3⁺（励起光波長成分を反射し、より長い蛍光波長成分を透過させる二色性ミラー）を通過させて、蛍光成分を取り出し、さらに蛍光波長成分を通すように設計した干渉フィルタ1⁺5⁺を通して、レンズ1⁺6⁺で集光して励起スポット（101a, 101b, ...）の像を蛍光像（102a, 102b, ...）として結像させる。

~~10018~~

マルチ検出ユニット1⁺7⁺は、複数の励起スポットから生じる蛍光強度を実質的に同時に検出する。マルチ検出ユニット1⁺7⁺からの光信号は、データ処理・制御ユニット1⁺9⁺からのタイミングに合わせてA/D変換ユニット1⁺8⁺で数値化され、データ処理・制御ユニット1⁺9⁺で各種演算等の処理が行われる。また、データ処理・制御ユニット1⁺9⁺はXYZ駆動ユニット2⁺0⁺の移動の制御を行い、このXYZ駆動情報と合わせて基板2⁺の面での蛍光強度の2次元分布を構築し、モニタ2⁺1⁺に表示する。これによって、基板2⁺の所定の領域面での蛍光強度分布、基板2⁺に設けられた複数の微小領域毎の全蛍光強度等を測定でき、固定したオリゴヌクレオチドに結合した検体DNAの量を算定できる。

~~10019~~

ここでは、基板2⁺面での励起スポットの大きさは2 μ m径、励起スポット間の間隔は20 μ m程度になるようにする。励起スポットの大きさは励起スポット間の間隔の整数分の1倍になるように調整するのが望ましい。励起スポットを64個形成すると、スポット群の両端の間隔1.26mmであり、対物レンズとして、視野が1.3mm、蛍光集光効率をよくするため開口数がNA=0.70、レンズ先端から試料位置間での距離はガラス裏面から照射する場合を考慮して1.3mmのものを作製し使用した。

~~10020~~

基板2⁺の注目領域全面を蛍光計測するためには、次のようにXYZ駆動ユニット2⁺0⁺を動作させる。図1⁺5⁺にXYZ駆動ユニット2⁺0⁺の動作例の説明図を示す。励起スポットの並び方向をx軸とする。励起スポットS0, S1, S2, ..., S63を図のように、励起スポットS0の位置が(x, y) = (0, 0)になる

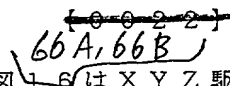
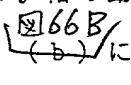
ファイル名 = A00011581A1.e1

ように初期位置に配置する。領域700はDNAプローブアレイのオリゴヌクレオチド固定化領域を含む測定する注目領域を示す。この領域700の全面を走査するために、ステージを2次元的に動かす。図には、領域700に相対的に励起スポットS0の動く軌跡を矢印で図示した。

~~(0021)~~

まずy方向に領域700の全幅を走査する。次いでy位置を0に戻すとともに、x方向に励起スポット径分(本例の場合は $2\mu\text{m}$)ずらす。再びy方向に領域700の全幅を走査する。この動作を励起スポットS0が最初のS1に届くまで複数回繰り返す。図では簡単のため、励起スポット間隔が $8\mu\text{m}$ に相当するように縮小して図示しており、4回x方向の位置を変えてy方向に全幅を走査する様子を図示した。なお、励起スポット $2\mu\text{m}$ 径、励起スポット間隔 $20\mu\text{m}$ で有れば10回繰り返すことになる。これにより、 $x=0\sim1280\mu\text{m}$ の幅の領域全面が走査できる。次の動作は、y位置を0に戻すとともに、x方向に $1260\mu\text{m}$ ずらして、64個の励起スポットで走査を終えた領域の隣の領域に移動し、つまりS0のスポットがS64に相当する位置に移動し、上述の動作を繰り返す。これを繰り返して領域700全面を走査する。

~~(0022)~~

図1-6はXYZ駆動ユニット20のxy軸の動作曲線図であり、 (a)にはXYZ駆動ユニットのx方向の移動状態、 (b)にはXYZ駆動ユニットのy方向の移動状態を図示したものである。このようにx方向つまり励起スポットの並び方向では、 $2\mu\text{m}$ という微小幅のステップ的な移動をn回(本例では10回)、次いで大きな幅の移動を1回という、少なくとも2種類の移動パターンを繰り返して、測定領域全面を走査することに本駆動ユニットの動作の特徴がある。これは、対物レンズの視野の大きさに制限が有り、複数の励起スポット間隔には制約があることによる。もし、励起スポット間隔が、測定領域全面の幅を64でほぼ均等分割した幅にすれば、上記の様な移動方式をとる必要は無くなり、x方向は励起スポット径分の微小幅のステップ的な移動を繰り返すだけでよい。しかし、この場合、両側の励起スポットの間隔が広く、ほぼ測定領域全面の幅に等しくなってしまう、通常の対物レンズ($2\mu\text{m}$ 程度の励起スポットを形成でき

ファイル名 = A00011581A1.e1

る対物レンズ)の視野幅を超え、測定が困難になる。もし十分な視野幅を有する対物レンズがあっても、開口数が小さくなってしまうか、非常に高価な対物レンズとなり、現実的ではない。つまり、図⁶⁵及び図^{66A, 66B}に示した走査方式は複数の励起スポットを使って測定領域全面を走査するのに適当な方式である。

~~[0023]~~

また、走査時のデータ収集のタイミングは、x方向に移動時、y方向に移動時の2通りがあり、原理的にどちらでも全面の情報を得ることが可能である。しかし、特にy方向の移動に合わせてデータを収集するのが都合が良い。これは一回の移動のストロークがy方向で長いため、隣の画素とのつながりがより明確であり、測定したデータから画像を再構築するのが容易で、確実であるためである。

~~[0024]~~

次に、マルチ光源分配ユニット11^fの構成について説明する。励起スポットの大きさが $2\mu\text{m}$ 径、励起スポット間の間隔が $20\mu\text{m}$ のとき、マルチ光源分配ユニット11^fの出射端では、対物レンズを含めた結合倍率を20倍として、出射端での光スポットの大きさが $40\mu\text{m}$ 径、光スポット間の間隔が $400\mu\text{m}$ で64箇所から光が出る必要が有る。 $400\mu\text{m}$ 間隔で光源を並べることは通常不可能であり、本発明では、下記のような構成を構築した。それらを図⁵²~図⁵⁷、図⁵⁹~図⁶⁷を使って説明する。

~~[0025]~~

図⁵²は、n個(図にはそのうち2個を示した)のレーザ光源からの光を4n個の光に分配するマルチ光源分配ユニット11^fの構成例を示す図である。レーザ光源(10a, 10b)からの光を各々レンズ(200a, 200b)で集光して光ファイバ(201a, 201b)に導入する。光ファイバは途中に2箇所の分岐箇所を有しており、これにより光が4分割され100a1, 100a2, ..., 100b4と励起光を分割できる。なお、分岐は図のような2分岐型ばかりでなく、4分岐型等種々選ぶことができる。また、このような分岐では、均一に光が分割するようなファイバを使用する。例えば、コア径が $40\mu\text{m}$ 程度の光ファイバ出射端を $400\mu\text{m}$ 間隔で1直線上に並べ、 $1/20$ 倍に縮小投影することで、本例の構造を実現できる。

~~10026~~

図3は、単純にm個（図にはそのうち4個を示した）のレーザ光源からの光を、 $400\mu\text{m}$ の間隔で1直線上に並べる別の方式のマルチ光源分配ユニット11の構成例を示す図である。図では、 $m=4$ の場合を示している。レーザ光源（10a, 10b, 10c, 10d）からの光を各々レンズ（200a, 200b, 200c, 200d）で集光して光ファイバ（202a, 202b, 202c, 202d）に導入する。光ファイバ出射端を $400\mu\text{m}$ 間隔で1直線上に並べることで、光（100a, 100b, 100c, 100d）を $400\mu\text{m}$ 間隔レーザ光源の大きさによらずに本発明の構造を実現できる。

~~10027~~

図4は、複屈折性材料（例えば方解石、それ以外の材料も使用可能）を利用したマルチ光源分配ユニット11の構成例を示す図である。方解石などの複屈折性材料300及び302と、1/4波長板301及び303を、図のように、レーザ光源側から複屈折性材料300、1/4波長板301、複屈折性材料302、1/4波長板303の順に組み合わせて分配素子310を作る。レーザ光源10aからの光をレンズ200aを通して上記素子に入射させる。この際レーザ光の偏光面を45度傾けるか、又は途中で1/4波長板を通して円偏光にしておく。複屈折性材料300に入射したレーザ光は複屈折し、常光線と異常光線とに分離する。それらがw1だけ離れるように複屈折性材料300の長さを調整する。この光をさらに1/4波長板301を通して円偏光にし、複屈折性材料302に入射させる。2つに分かれた光は同様にさらに2つに分かれる。その距離がw2になるように複屈折性材料302の長さを調整する。w1がw2の2倍になるように調整することでレーザ光を均等の間隔に分割することができる。なお、 $w2=400\mu\text{m}$ にするには、複屈折性材料300及び302の長さ（光軸方向）は各々約8mm及び約4mm（複屈折性材料が方解石で結晶軸が光軸に対して45度の場合）程度にすればよい。なお、各複屈折性材料の長さは、材料種、波長、結晶軸の傾きにより変わるが、結晶軸の方向が同じ場合、複屈折性材料の長さは上述の様に前段の複屈折性材料の長さの1/2にすればよい。

~~10028~~

ファイル名 = A00011581A1.el

この構成では、1個のレーザ光が4つに均等に、ほぼ同じ強度で、出射端が1直線上に配置するようにできる。そこで、レーザ光を0.4×4=1.6mm間隔で16個配置すれば64個の光スポットを0.4mm間隔に1直線上に配置することができる。なお、レンズ200aの焦点位置をピンホール304^fの位置にすることで、散乱光等の余分な光を除去することができ、基板2^f上の励起スポットの形状をきれいにすることができ、分解能を向上させることができる。さらに共焦点測定用の1つの焦点位置として利用できる。

~~{0020}~~

また、図中の分配素子310^fは2段で分割する構造であるが、3段、4段、6段にすることもでき、その場合1個のレーザ光がそれぞれ8, 16, 64に分割されることになり、64個の光スポットを得るのに必要なレーザ光の本数も8, 4, 1と少なくすることができる。例えば、各複屈折性材料の長さを、光入射側から順に、32, 16, 8, 4, 2, 1mmのものを使用した6段構造の場合は、1本のレーザから0.1mm間隔の64個の光に分割することができる。

~~{0030}~~

図5^fは、マルチ光源分配ユニット11^fの別の構成図である。素子は大きく4つの台形のガラスプリズム3^b1, 3^b2, 3^b3, 3^b4と1/4波長板3^b7により構成される。ガラスプリズム3^b1と3^b2, 3^b3と3^b4は図のように接合し、接合面3^b5, 3^b6は偏光ビームスプリッターになっている。各ガラスプリズムは僅かにその寸法が異なっており、円偏光状態の入射光は、接合面3^b5で2つに分かれ、全反射の後再び近接する。このとき光路長に差をつけることにより2つの平行なレーザ光束を得ることができる。1/4波長板3^b7を通して、再びガラスプリズム3^b3と3^b4の素子部に入射させると、上記と同じ原理で、さらに光が2つに分割し、計4つの光束をつくることができる。光束同士の間隔は、台形のガラスプリズムの高さを調整することで任意に設定でき、0.4mm間隔という非常に近接した光束を得ることが容易にできる。図では、入射光束8個に対して出射光束が32個の場合を示している。なお、1/4波長板3^b7に近接してピンホール版を配置しても良い。

~~{0081}~~

ファイル名 = A00011581A1.e1

図⁵⁶は、マルチ光源分配ユニット 1⁵⁷の別の構成例を示す図である。偏光ビームスプリッターと全反射ミラーを有する図のようなプリズム 500a, 500b ... を使うことでビームを 2 分割でき、これを 8 個使うことで 8 個のレーザ光源からの光を 16 個にする。なお、偏光ビームスプリッターの部分は透過率 = 反射率 (= 50% 程度) のハーフミラー状のビームスプリッターにしてもよい。

図⁵⁷は、マルチ光源分配ユニット 1⁵⁷の別の構成例を示す図である。図⁵⁶のプリズム様の~~プリズム~~を並べ、さらにその上にサイズを大きくしたプリズムを順番に重ねたプリズム 510 を使う。レーザ光はハーフミラー状のビームスプリッターで分割される。これを 4 段繰り返すことで、1 個のレーザ光を 16 個に分割できる。

図⁵⁶及び図⁵⁷の構成のマルチ光源分配ユニットでは、プリズムの大きさを小さくするのに限界がある。分割するレーザ光同士の間隔は 1 mm 程度までは可能であるが、さらに狭くするのは次第に困難になってくる。そのため、このような場合には、既に説明した図⁵⁴又は図⁵⁵のマルチ光源分配ユニットと組み合わせて使用することで、より微小間隔の光束に分割できる。

一般に、図⁶⁷に示すマルチ光源分配ユニットの構成例のように、複数のマルチ光源分配ユニット 550, 551 を組み合わせて、別のマルチ光源分配ユニットを構築することができる。つまり、図⁵²から図⁵⁷、さらには後述する図⁶⁸, ⁶⁹までを組み合わせてマルチ光源分配ユニットを構築することができる。なお、レーザ光源の数は、分割される数とレーザ光源の光出力と、基板⁵⁷2の面で必要な励起スポットの光強度を基に適切に選定する。

図⁶⁸は、マルチ光源分配ユニット 1⁵⁷の別の構成例を示す図である。レーザ光源 2000 からの光をレンズ 2001 を通し、ガルバノミラーやポリゴンミラーなどのビーム走査部 2002 によりレーザ光を走査し、レンズ 2001 の焦点位置に円弧上にその端面を配置した光ファイバ 3001, 3002, ... の端面に

ファイル名 = A00011581A1.e1

入射する。光ファイバ3001, 3002, ...のもう一方の端面を一定間隔で配置することで、多数の光束に分割することができ、本発明の構造が実現できる。

~~(0036)~~

図⁶⁹~~19~~は、マルチ光源分配ユニット1⁵~~1~~の別の構成例を示す図である。レーザー光源2000からの光を、ガルバノミラーやポリゴンミラーなどのビーム走査部2003により走査し、レンズ2004を通し、一列に並べた光ファイバ3001, 3002, ...の端面に入射させる。光ファイバのもう一方の端面からそれぞれ分割されたレーザー光を取り出すことができ、本発明の構造が実現できる。

~~(0037)~~

次に、マルチ検出ユニット1⁵⁸~~7~~の構成図について図⁵⁸~~8~~～図⁶³~~13~~で説明する。本例のように励起スポットの大きさが2 μ m径、励起スポット間の間隔が20 μ mの像を適当な倍率で結像させる。倍率は検出器のピッチによって決定される。光電子増倍管、ホトダイオード等の検出器⁵⁹~~600~~, ⁵⁹~~601~~, ...を結像位置に合わせて並べたり(図⁵⁸~~8~~及び図⁵⁹~~9~~)、ホトダイオードラインセンサ又はマルチアノード型光電子増倍管、CCDラインセンサ等のセンサ⁶⁰~~602~~で検出する(図⁶⁰~~10~~及び図⁶¹~~11~~)。センサ⁶⁰~~602~~では、個々の検出器の間隔を図⁵⁸~~8~~等の方式に比べて狭くできる。例えば、マルチアノード型光電子増倍管では個々のアノードの間隔が1mm程度であり、50倍の結像倍率になるように光学系を調整する。なお、図⁵⁸~~8~~及び図⁵⁹~~9~~及び図⁶⁰~~10~~のピンホール⁶⁰~~610~~を用いることで、共焦点検出系になり位置分解能、深度分解能が向上し、蛍光計測の精度が向上する。ホトダイオードやCCDラインセンサを使えば、任意の位置に結像させ、結像位置の画素の信号強度を検出しても良い。励起スポットの像以外の部分の画素の信号を排除することによりピンホールと同様の効果を得ることもできる。また、光ファイバ⁶²~~620~~及び⁶³~~621~~を介して検出することもできる(図⁶²~~12~~及び図⁶³~~13~~)。

~~(0038)~~

図⁶⁴~~14~~は、本装置を用いて計測された画像の一例を示す図である。図はスライドガラスに捕捉された蛍光スポット像を示す。

スライドガラスに前述の方法で蛍光標識DNAが結合したスポットを作成した。各スポットの大きさは約200 μ mで、約0.4mm間隔の格子上に作成した

ファイル名 = A00011581A1.el

。スポットを作成した全体の領域は縦横約 12 mm であり、図 ⁶⁴ ~~1-5~~ はその一部を表示したものである。図中、各スポットは、上から順番に試料濃度を大きくしたものであり、結果として、上から下に順番に蛍光強度が大きく検出されている。

~~(0-0-3-9)~~

次に、データの検出、画像再構成（データ処理ユニットの動作）について説明する。12 mm 角の領域を 2 μ m 単位で信号を検出するため、12 mm 角の領域は 6000 \times 6000 の領域に分けられる。それらを $area(i, j)$ とする。i (=0-5999) は X 方向、j (=0-5999) は Y 方向の位置とする。照射スポットの走査による蛍光強度分布の測定は、図 ⁶⁵ ~~1-5~~ で説明したようにして行う。各照射スポット (S0, S1, ..., S63) による走査について説明すると、照射スポット S0 は、まず $area(0, 0)$ に照射し、ついで Y 方向のスキャンに従って $area(0, 1)$ から $area(0, 5999)$ までの領域をスキャンする。照射スポット S1 も、まず $area(10, 0)$ に照射し、ついで Y 方向のスキャンに従って $area(10, 1)$ から $area(10, 5999)$ までの領域をスキャンする。他の照射スポット S3 から S63 も同様であり、照射スポット S63 も、まず $area(630, 0)$ に照射し、ついで Y 方向のスキャンに従って $area(630, 1)$ から $area(630, 5999)$ までの領域をスキャンする。

~~(0-0-4-0)~~

そのとき、各スポットに対応した光検出器の信号を領域の通過毎にサンプリングして AD 変換する。信号は $sig(k, j)$ と表され、k はスポットの位置番号 (0-63) に対応し、j は Y 方向の位置で 0-5999 の値をとる。つまり、スポット S1 の信号は $sig(1, j)$, j=0-5999 となる。これらの信号を、 $area(i, j)$ の領域に対応したイメージ像格納メモリに格納していく。イメージ像格納メモリを $image(i, j)$ 、i (=0-6399) は X 方向、j (=0-5999) は Y 方向の位置とすると、まず上記 1 回のスキャンで得られた信号を $image(k \times 10 + X, j) = sig(k, j)$ (X=0, k=0-63, j=0-5999) に格納する。なお、X はスポット S0 の X 位置を表す (この場合、X=0)。

~~(0-0-4-1)~~

ついで、図 ⁶⁵ ~~1-5~~ に示すように、Y 位置を 0 に戻し、X 位置を +2 μ m 移動して (X=1)、同様に測定する。得られた信号を $image(k \times 10 + 1, j) = sig(k, j)$ (k=0-63, j=0-5999) に格納する。この操作を計 10 回繰り返すと、 $image(i, j)$ のうち

ファイル名 = A00011581A1.e1

, $i=0-639, j=0-5999$ の領域が測定した信号に置き換わる。

~~[0042]~~

次に、X 位置を $+1260 \mu m$ 移動して ($X=640$ の位置)、上記動作をさせ、同様に、 $image(k \times 10 + X, j) = sig(k, j)$ ($X=640-649, k=0-63, j=0-5999$) に格納する。この動作で、 $image(i, j)$ のうち、 $i=640-1279, j=0-5999$ の領域が測定した信号に置き換わる。更に、X 位置を $+1260 \mu m$ 移動して ($X=1280$ の位置)、上記測定を繰り返す。これらを繰り返して、X 位置が $X=5760$ の位置まで移動し、更に 10 回スキャンさせることで $image(i, j)$ の $i=0-6399, j=0-5999$ の全領域が測定される ($area(i, j)$ よりも領域が広いが必要な分のみ取り出せばよい)。この $image(i, j)$ を画像化して、モニタに表示等する。

~~[0043]~~

本例では、励起スポット、及び各スポットに対応した光検出部を有する。全ての励起スポット強度、光検出部の感度特性が揃っていればよいがそうでない場合、得られる画像に縞模様が発生する。このような場合、各スポット毎の感度特性を補正する機構が必要である。図 51 に強度補正值格納ユニット 22 を設ける。補正処理を行うには、まず、補正用データを作成する。均一な蛍光強度を有する試料を用意し (又は各スポット位置で均一に発光する光源を配置し)、そのときの強度をスポット毎に測定する。さらに光を遮光したときの強度もスポット毎に測定し、各スポット測定毎のバックグラウンド値 $back(k)$ と、基準となる光強度を検出したときの信号強度の値 (バックグラウンド値を差し引いた値) の逆数値 $corr(k)$ (k はスポットの位置の番号 ($0-63$)) を強度補正值格納ユニット 22 に格納しておく。測定された信号 $sig(k, j)$ に対して、 $sig(k, j) = (sig(k, j) - back(k)) \cdot corr(k)$ と補正した信号値 $sig(k, j)$ を出力することで、スポット間の感度ばらつきを補正することができる。

~~[0044]~~

本発明によると、通常の装置は蛍光励起用の照射スポットを 1 個だけ用いているのに対して、複数 (例えば、64 個) の蛍光励起用の照射スポットを基板に同時に照射できるため、下記の効果がある。

~~[0045]~~

全面積を一定時間で検出する場合に、1照射スポットあたりの照射時間を大きくする（本例では64倍）ことができ、蛍光検出感度が向上する。また、1照射スポットあたりの照射時間が大きくなることで、ステージの移動速度を遅くすることもでき、機械的な安定度、耐久性も向上できる。また、一点あたりの照射時間を同じにすれば、基板の所定の領域全体を測定する時間が短縮でき、高速化が達成できる。特に、検出の分解能を上げる場合、つまり基板上の照射スポットの大きさをより小さくしていく場合、例えば従来10 μ mの分解能で測定したものを1 μ m～2 μ mの分解能で測定すると100倍～25倍の数の照射スポット領域を順次計測する必要があるが、本発明のように複数（64個）の蛍光励起用の照射スポットを同時に照射し、蛍光検出することで、高分解能と高速化を達成することができる。

なお、レーザ光を分割照射すれば分割された個々のレーザ光強度はその分弱くなるが、より出力の大きなレーザ装置を使うことでこの問題は容易に解決する。

~~[0046]~~

~~[発明の効果]~~

本発明によれば、DNAプローブアレイ等を高分解能、高速、高感度で測定することが可能になる。



~~(0021)~~

~~【発明の実施の形態】~~

図1は本発明の実施形態図である。レーザ光源21⁹1, 21⁹2, 21⁹3...は635nmの波長を有する半導体レーザから出射した拡散光を丸い平行ビームにしたものである。各レーザ光源から出射したK個の光ビームはピッチPの間隔でマルチビームスプリッタ22⁹に入射する。マルチビームスプリッタ22⁹はピッチPでK個並び、入射した各ビームを2分し、ピッチP/2の2K個の平行に進むビームを形成する。これらのビームは図示された座標のyz軸に±45度の方向に長軸を有する楕円偏光又は直線偏光もしくは円偏光になっている。

~~(0022)~~

2K個のビームはピッチP/2で配列し、マルチレンズ23⁹1に入射する。マルチレンズ23⁹1はプリズム23⁹2に貼り付けられている。マルチレンズを透過したビームはプリズム23⁹2を通過し、プリズム23⁹3との境界にあるマルチピンホールに入射する。

~~(0023)~~

プリズム23⁹2及び23⁹3はそれぞれ厚さがわずかに異なる台形のガラスを底辺同士で接着しておりこの接着面が偏光ビームスプリット面になっている。この結果プリズム23⁹2を通過したビームはピッチP/4で4K個のピンホールを有するピンホールアレイ23⁹4の各ピンホールにビームを収束させる。ピンホールアレイはピンホール部以外に載る雑音となる迷光を除去し、DNAチップに雑音の少ないマルチスポットを照射する役割を持っている。



ファイル名 = D00005301A1.e1

~~10024~~

上記のプリズム 2 3 2^gを通過する際偏光ビームスプリット面を通過する光は P 偏光 (z に直交する直線偏光)、反射する光は S 偏光 (z 方向の直線偏光) になっている。このためマルチスポットを通過した光の半分は P 偏光、残りの半分は S 偏光になっている。

~~10025~~

ピンホールアレイの直後には 1 / 2 波長板もしくは 1 / 4 波長板がある。1 / 2 波長板は光学軸が上記の P および S 偏光に対し 22.5 度傾いている。また 1 / 4 波長板の場合には 45 度傾いている。ピンホール通過後このような波長板を通過した上記 P および S 偏光は 1 / 2 波長板の場合には z 軸に ± 45 度傾いた直線偏光に、1 / 4 波長板の場合には右および左回りの円偏光になる。

~~10026~~

上記の波長板 2 3 5^gを通過した光は前述の台形貼り合わせプリズム 2 3 3^g (但し台形プリズムの厚さの差は前述の台形貼り合わせプリズム 2 3 2^gの半分である) に入射する。このプリズムの台形の底辺である貼り合わせ面は偏光ビームスプリット面になっているため、上記のピンホールアレイおよび波長板を通過した 4 K 個の光は更に 2 倍に増え、ピッチが P / 8 で 8 K 個になる。このためあたかも 8 K 個の点光源 (2 次点光源) がピンホールアレイ 2 3 4^gの位置にあるようにプリズム 2 3 3^gから光が出射してくる。

~~10027~~

このようにしてできた 8 K 個の 2 次点光源からの光はレンズ 2 4^g、ミラー 2 5^g、光量調整器 2 6^g、波長選択ビームスプリッタ 3 0^g、高 NA 対物レンズ 3^gを通過し、DNA チップ 5^gの検出面 5 1^gにその 8 K 個の点光源像を結ぶ。なお光量調整器 2 6^gは検出面 5 1^gにある蛍光体の量の多少に応じて蛍光検出の励起光の光量を調整するためにある。即ち、蛍光体の濃度が DNA チップ或いは蛍光検出サンプル全体に亘り大きいときには駆動源 2 6 0^gを駆動し、例えば 10 % の ND フィルタ 2 6 2^gが励起光光路に挿入されるようにする。しかしこのような励起光全ビームの強度を代えることは検出のダイナミックレンジを狭めることにもなるので、個々の励起光マルチスポットの強度を、図示しない光変調器アレーで調整するこ

ファイル名 = D00005301A1.e1

とも可能である。

~~{0028}~~

また例えば 2^N のダイナミックレンジの検出が必要な場合、NDフィルタ 261 は 100% (NDフィルタ無し) とし、 $\sqrt{262}$ は $100 \times 2^{N/2}\%$ の透過率にしておき、全画面をNDフィルタを交換して2画面検出し、両画面を合成し 2^N のダイナミックレンジの蛍光画像を検出することも可能である。このように2画面を検出すれば2倍の時間を要するが、マルチスポットを用いる本発明は従来の方法に比べ5倍以上の速度で検出することができる。

~~{0029}~~

DNAチップの検出面に照射された8K個の点光源像はプローブDNAにハイブリダイゼーションされた先端に蛍光体を持つターゲットDNAを照射し、励起する。

~~{0030}~~

図2はDNAチップ5のガラス51上のターゲットDNAがある領域50の詳細とマルチスポットの関係を表した図である。50はセルである。このセルはxy方向に一定ピッチで配列している。この各セルにはその配列の番地毎に所望のDNA断片がガラスに付着されており、プローブDNAとも呼ばれている。このプローブDNAは通常各セル内では同じ塩基配列からなるDNAであり、異なるセルでは通常異なるDNAがプローブされている。このように用意されたDNAチップに検査対象である生物の検体から収集し、精製、増幅した複数種のDNA断片の端に蛍光体を付着させたターゲットDNAサンプル液を流し、ハイブリダイゼーションを起こさせる。即ち各セルのプローブDNAの塩基配列に対応するターゲットDNAが結合、即ちハイブリダイズする。図2のDNAチップは以上のようにしてできている。

~~{0031}~~

セル501に対し励起光であるマルチスポット2001, 2002, 2003, ..., 20Mはセルピッチの整数倍のピッチで並んでいる。図2の場合この整数は2である。マルチスポットのビーム径はおおよそ Δ 、マルチスポットのピッチは $N\Delta$ で、図2の場合 $N=10$ で、1セル当たり 5×5 の絵素に分割して検出し

ファイル名 = D00005301A1.e1

ている。このような分割を行うのはセル内に異物等が付着すると、この異物で強い蛍光を発生し検出データに誤差が生じるため、強い蛍光検出強度以上の絵素は異物によるものと判断し、その部分を除いてセル内の平均蛍光強度を求めるためである。

~~(0032)~~

71/
DNAチップを図2のAのごとくx方向に走査し、マルチスポットがセルの右端まで走査すると1絵素Δ分y方向に移動し、再びx方向に走査する。これを繰り返し、N絵素(図では10絵素)走査し終わると、MNΔ分y方向に移動し、上記動作を繰り返し、全セルを走査する。72/
図3は上記の動作を表したものである。横軸に時間を取り、上のグラフは縦軸にyステージの移動量、下のグラフは縦軸にxステージの移動量を示したものである。xステージは時間 t_s で走査検出し、時間 $t_t - t_s$ で元の位置に戻る。往路のみで検出を行っている。ステージの精度が十分良好な場合には復路でも検出が可能である。

~~(0033)~~

70/
同時に検出されるM絵素分の蛍光検出は図4に示すように励起光のマルチスポット照射で発生した蛍光を対物レンズ3^gで受け、対物レンズを透過光した蛍光は波長選択ビームスプリッタ30^gで、蛍光波長の670nm近傍の光を反射させる。ここで反射した蛍光は検出系に導かれる。即ち、ミラーもしくは波長分離スプリッタである32^g、34^g、35^g及び38^gと、結像レンズ33^gを通過し、マルチチャンネルフォトマル101^g及び102^g上の受光開口に結像する。各受光開口には励起光のマルチスポットの像とほぼ同程度の径であるピンホールが開いている遮光板が設けられており、このピンホールを通過する蛍光のみが検出され、共焦点検出が行われる。

~~(0034)~~

73/
図4上のグラフは図3下のグラフの時間軸を拡大したものである。1回の走査に要する時間 t_s を更に細かく見ている。72/
図4下のグラフは図4上のグラフと横軸の時間軸は等しく、縦軸はフォトマル等の微弱光検出器によるフォトンカウント時間のタイミングを示している。このグラフの意味は信号レベルが1の時間フォトンカウントを行っており、0の時はフォトンカウントを行わない。一区切り

ファイル名 = D00005301A1.e1

の 1 の間は 1 絵素分の信号検出になっている。0 になり、次に 1 が始まると次の絵素を検出することになる。x 方向の 1 走査の間に L_x 個の絵素があるため 1 絵素当たりの検出時間は t_s / L_x 以下となる。1 絵素毎に行うフォトンカウントの時間は DNA チップのセルの位置に対応している必要がある。従ってフォトンカウントの開始の時間は x ステージの位置測定用測長器の信号に基づいて信号を作る。

~~{ 0 0 3 5 }~~

1 絵素のフォトンカウント終了時刻をステージの位置測長器の情報に基づいて決定すると、ステージが一様に動かないとき、フォトンカウント時間が絵素毎にばらついてしまう。そのため、終了の時間は開始の時間から一定の時間後になるようにする必要がある。このため高周波（周波数 ν_r ）のパルス発生器のパルスを計数し、フォトンカウントスタートから計数し、一定のパルス数 N_r になったらフォトンカウントを終了するようにする。即ちどの絵素についても N_r / ν_r 秒の時間に亘りフォトンカウントを行う。図 ⁷⁰ ~~70~~ の制御回路 ⁷⁴ ~~74~~ 1 は上記の動作を制御する系であり、1 ⁷⁴ ~~74~~ 2 は PC（パーソナルコンピュータ）であり、ここで総ての動きのコントロールを行っている。1 ⁷⁴ ~~74~~ 3 は上記のステージ ⁷⁴ ~~74~~ 4 の制御、駆動信号を発生し、またステージ ⁷⁴ ~~74~~ 4 の位置情報を測長器から取り込んでいる。

~~{ 0 0 3 6 }~~

以上のようにして 64 絵素同時に、かつステージの走査により次々に x 方向の絵素の蛍光を検出していく。各絵素で得られフォトンカウント信号 S_{PM} は図 ⁷⁴ ~~74~~ 5 に示すようにして検出される。即ち、マルチチャンネルフォトマルの 1 個のフォトマルに着目すると、微弱な検出蛍光の場合、フォトマル信号は図 ⁷⁴ ~~74~~ 5 の上のグラフに示すように低い頻度でパルス時間幅が約 30 ns 程度のフォトン検出パルス信号が得られる。この信号の立ち上がりから一定幅のパルス信号を発生させるか、或いはコンパレータ回路により図 ⁷⁴ ~~74~~ 5 上グラフに示すように一定信号レベル I_T 以上の場合に図 ⁷⁴ ~~74~~ 5 下グラフの信号 S_{PC} のように一定レベルの信号になるようにする。このようにして作られたパルス整形信号をカウンタで計数することにより検出時間 $t_s / L_x - \Delta t = N_r / \nu_r$ 時間内の検出フォトン数を求めることができる。

ファイル名 = D00005301A1.e1

~~[0037]~~
75A-75B

図8は検出蛍光強度が大きい場合の例である。フォトマル検出信号 S_{PM} とコンパレータ後の信号 S_{PC} を示している。フォトンパルスが高頻度で検出されるため一部分で2つ以上のパルスが重なって検出されている。このためコンパレート後の信号の幅が広いものが現れている。 S_{PC} は信号 S_{PC} の時刻Aと時刻Bの間の時間を拡大した図である。検出信号が前後に重なって検出されるとコンパレート後の信号はパルスの幅が広がる。この結果コンパレート後のパルス数を単純に数えたのでは誤差が大きくなる。そこで図8の最下段のグラフに示すように S_{PC} をゲートにして、一定の高周波パルス信号を計数する。この計数信号 S_{PWC} を用いれば S_{PC} 信号のパルスを計数するより正確にフォトン数を求めることが可能になる。更に S_{PWC} 信号の計数値を下に凸な1価関数 $F(S_{PWC})$ で補正することにより更に正確なフォトン計数を行うことが可能である。

~~[0038]~~

しかしDNA検査で要求される更に広いダイナミックレンジを実現するには、上記の方法では不十分である。即ちDNA検査では1絵素を検出する時間内で数フォトンパルスから10数万パルスまでのダイナミックレンジが要求されている。ところがフォトン検出パルスの幅は数十nsであるため、総てのダイナミックレンジをフォトンパルスカウントで行おうとすると、1絵素あたりに要する時間は数十ns × 10数万 = 数msec必要になる。

~~[0039]~~

マルチスポット励起光の数が64としても、絵素数が6000 × 6000あると、30分近く検出にかかることになる。

~~[0040]~~

図9はこの問題を解決する実施例である。101のマルチチャンネルフォトマルの出力信号をアナログスイッチ1Aに入力する。PC10によりアナログスイッチの初期状態はB即ちフォトンカウント回路1Bに接続されている。このことは蛍光検出を絵素毎に行うとき、先ずフォトンカウントを行うことを意味する。

図8はフォトンカウント信号の経時変化を表しており(a)及び(b)は蛍光が非常に小さく、フォトンカウント検出で蛍光強度を求める場合である。

ファイル名 = D00005301A1.e1

~~T0041~~
 77A
 図8 (a) はフォトマル検出したフォトンパルス信号をコンパレータで2値化したパルス信号 S_{PC} である。~~77B~~ ~~77A~~ (b) は (a) のパルス信号のパルス数を計数した計数信号 $N S_{PC}$ である。この計数信号 $N S_{PC}$ が計数開始後 $\alpha (t_s / L_x)$ 時間経った時点で決められた閾値 N_0 を越えなければアナログスイッチはこのままの状態でフォトンカウントを継続し、1 絵素分の蛍光検出時間 $t_s / L_x - \Delta t$ の間フォトンカウントを行う。この判断を行う時点である計数開始後の時間 $\alpha (t_s / L_x)$ は α として 0.01 から 0.3 程度で良い。即ちこの時間の間にフォトンカウントパルスが最大で 10 前後以上入って来る程度の時間以上であればよい。上記の最大でと言う意味はこの時間内でパルス信号が最超密に発生した場合である。

~~T0042~~
 77C, 77D, 77E
 図8 (e) (a) は蛍光が大きくなりフォトンカウントを行うと不都合を生じる場合である。即ち2個以上のフォトンカウントパルスが同時或いは一部重なってしまうような場合である。この場合コンパレータ後のパルス信号 S_{PC} は図8 (c) の様に一部重なったパルスは幅広くなる。図8 (d) は (e) のパルス信号の計数信号 $N S_{PC}$ である。 $N S_{PC}$ は $\alpha (t_s / L_x)$ の時点で閾値 N_0 を越えており、フォトンカウントによる蛍光検出に適さないことが分かる。この時点で図 76 のアナログスイッチをCに接続し、~~積分~~ 回路1Cによりアナログ的にフォトマル信号を積分する。このように各絵素毎にフォトンカウントで検出するかアナログ積分で検出するかを判断し、最適な方法をその都度選んで検出していく。

~~T0043~~
 77C
 なお図には示さないが、図8の (e) より更に蛍光が大きくなると (e) のパルスが重なってしまい、パルス計数値は数個又は0個になる。このときには図8 (d) のようにして S_{PC} を一定周波数の矩形の高周波パルスでカウントする信号 S_{pwc} の信号を用いれば、このパルスカウント信号 $N S_{pwc}$ は図8 (e) のようになる。この $N S_{pwc}$ 信号を用いることにより、閾値 N_1 よりこの値が大きいことを判断し、アナログスイッチをCに切り替えれば、更に強い蛍光検出の場合でも間違えずにアナログ検出が可能になる。

ファイル名 = D00005301A1.e1

~~{ 0 0 4 4 }~~

アナログ検出に切り替えられれば、回路 1 C により切り替えられた時点をスタート時点として積分を開始する。図 ~~9(a)~~^{78A} に示すように着目絵素検出開始時刻を起点（仮にこの時刻を時刻 0 とする）にして時刻 $\alpha (t_s / L_x)$ から積分を開始し、フォトンカウントの場合同様に時刻 $t_s / L_x - \Delta t$ まで積分を行い、この時点で積分値を回路 1 C で A D 変換する。A D 変換されたデジタル情報 1 C 0 1 は回路 1 0 0 に送られる。蛍光強度が弱い場合にはフォトンカウントを継続し、時刻 0 から時刻 $t_s / L_x - \Delta t$ 間での間のフォトンカウント信号が計数され、このデジタル情報 1 B 0 1 も回路 1 0 0 に送られる。マルチチャンネルのフォトマル 1 0 1 の各チャンネルから上記のようにして回路 1 0 0 に並列的に転送されたフォトンカウントデジタル信号及びアナログ積分デジタル信号の結果をパソコン P C である 1 1 に転送する。各チャンネルでの検出がフォトンカウントかアナログ積分かは前記のように時刻 $\alpha (t_s / L_x)$ の時点で分かっているので、P C 1 1 で検出に適した方を各チャンネル毎に選択し採用する。即ち図 ~~76~~^{78A} の 1 C 0 1、1 C 0 2 ……にはこの選択信号も同時に送られている。

~~{ 0 0 4 5 }~~

なお上記の実施例ではフォトンカウントを選択するかアナログ積分を選択するかを時刻 $\alpha (t_s / L_x)$ で判断しているが、検出の初めから同時に両方式で並列に検出しておき、 $(t_s / L_x) - \Delta t$ 後に選択を行っても良い。

~~{ 0 0 4 6 }~~

アナログ積分検出を実行するときの、積分信号の変化を図 ~~9(a)~~^{78A} に示す。アナログ積分検出をスタートする時刻 $\alpha (t_s / L_x)$ から時刻 $t_s / L_x - \Delta t$ の間で蛍光検出光の強度の大きさに比例した傾きで積分値が大きくなり、時刻 $t_s / L_x - \Delta t$ における積分値がサンプルホールドされ、A D 変換される。こ~~X~~のようなアナログ検出により 2 桁近いダイナミックレンジに亘る信号強度変化を捕らえることが可能になる。

~~{ 0 0 4 7 }~~

更に強い蛍光検出の範囲に亘り検出を可能にする方法を図 ~~9(b)~~^{78B} を用いて説明する。時刻 $t_s / L_x - \Delta t$ に至る前に積分値が飽和しているので、この時刻で

ファイル名 = D00005301A1.e1

検出することはできない。しかし、図 ~~6 (a)~~ ^{75d} で用いている高周波パルス信号 S_{hc} を用いて積分をスタートさせた時刻 $\alpha (t_s / L_x)$ から飽和する時刻 t_F までの時間 $(t_F - \alpha (t_s / L_x))$ を計数すれば飽和値 I_F が予め分かっているの
 で、この検出強度 I が次式で求まる

$$I = I_F \cdot ((1 - \alpha) t_s / L_x - \Delta t) / (t_F - \alpha (t_s / L_x))$$

このように積分開始から飽和時間までを計測することにより更に 1 桁近くダイナミックレンジを広げることが可能になる。

~~[0048]~~

このような飽和の時刻を計数するには図 ~~7~~ ⁷⁶ に示すアナログ積分回路に以下の機能を追加すればよい。即ち、1 C の積分回路の積分信号を第 1 の入力とし、予め決めておいた飽和値に相当する信号レベルを第 2 の入力としてコンパレータ回路に入力することにより、その信号出力の結果の変化から計数終了とすることにより可能である。

~~[0049]~~

以上説明したようにマルチチャンネルフォトマル ~~101~~ ² 及び ~~102~~ ² で検出される蛍光は 64 チャンネル並列に検出され ~~100~~ ² で並列に入力された信号を時系列的な信号に変換し P C ~~11~~ ² に転送する。図 ~~1~~ ⁷⁰ の x ステージを走査し、図 ~~2~~ ⁷¹ に示すように y 方向に並ぶ 64 絵素を同時に、かつ x 方向は順次検出していく。図 ~~3~~ ⁷⁰ の x y ステージ ~~4~~ ² にはそれぞれ図示されていない光学的な測長器が付いており、x 及び y ステージの移動量が測定される。DNA チップの蛍光検出絵素の寸法 Δx 及び Δy は例えばそれぞれ $2 \mu m$ であるとする。各絵素の測定の開始は x ステージの測長器が $2 \mu m$ 移動を計測する時点から始まる。

~~[0050]~~

本発明のマルチスポット蛍光検出或いはマルチスポット DNA 検査の具体的な実施例を以下に説明する。x 方向は走査の動作、y 方向は x の 1 走査毎に 1 絵素分シフトする動作、更に x は 10 走査毎に y 方向に大きくシフトし、これを繰り返すことにより、2 次元的に検出或いは検査を行う。

~~[0051]~~

x 方向の走査で計測開始のステージ位置測長信号を検出すると、先ずフォトン

ファイル名 = D00005301A1.e1

カウントの計数を開始する。x 方向の検出絵素数 L_x が 6 4 0 0、絵素ピッチが $2 \mu m$ とし、この $2 \mu m$ を走査する時間 t_s を $60 \mu sec$ とする。フォトマルが 1 フォトンを受光し、発生するパルスの幅は $30 n sec$ 程度であるので 1 絵素をスポットが通過する時間 $60 \mu sec$ のうち $40 \mu sec$ の間フォトンカウントを行う場合、数百～千のフォトンフォトンカウント法で計数することが可能になる。これ以上の強度の信号に対してはパルス信号が繋がってしまうためアナログ積分検出を行う。このアナログ検出のダイナミックレンジはおよそ百程度ある。従ってフォトンカウントとアナログ積分を上記の方法で切り替えて併用すればおよそ 1 万のダイナミックレンジが得られる。

~~{0052}~~
78B

更に図 9 の (b) で説明したアナログ積分が飽和する時間から検出強度を求める方法を併用すると更に 1 桁ダイナミックレンジを拡げることが可能になる。この結果およそ 2 の 16 乗、即ち 6 5 5 3 6 の広いダイナミックレンジに亘り、即ち $40 \mu sec$ で数フォトンの微弱な検出光から 10 万フォトンに達する強い検出光まで短時間で検出可能になる。

~~{0053}~~

以上説明した蛍光強度がフォトンカウントの領域、アナログ積分の領域、及びアナログ積分飽和時間検出領域と 3 つの領域からなる時、それぞれの境界はスムーズに繋がるようにするため、事前に境界領域に相当する強度の検出光を用いてキャリブレーションを行う。

~~{0054}~~

上記図 7 の実施例ではフォトンカウントとアナログ積分を時間分割して検出しているが、常時両方を行い、蛍光検出の強度に応じて採用する信号を選択することも可能である。

~~{0055}~~

上記の検出方式の切り替えは蛍光検出に限られたものではなく、一般に 1 絵素当たりの検出時間 T_p が短く限られている場合に有効である。即ち T_p とフォトン検出パルス時間幅 Δt の比 N_r が要求される検出のダイナミックレンジ N_d に比べ小さいとき、即ち

ファイル名 = D00005301A1.el

$$T_p / \Delta t = N_r < N_d$$

の時微弱なフォトンカウント領域からフォトンカウントでは計数不可能な強い光まで広い範囲で検出が可能になる。

~~{ 0 0 5 6 }~~

60 μ sec / 1 絵素のスピードで x 方向に 6000 絵素分走査し、この際 y 方向に 10 絵素とばして同時に 64 絵素検出しているため、360 msec かけて 1 走査が終了した時点で 384000 絵素が上記の広いダイナミックレンジで検出されている。1 走査が終了すると y 方向にステージを 1 絵素即ち 2 μ m 動かし隣の絵素ラインを同様にして検出する。この動作を 10 回繰り返し、640 \times 6000 絵素の検出を行う。ステージの戻りに要する加減速の時間を加えても、4 から 5 秒で上記の絵素数の検出が終わる。

~~{ 0 0 5 7 }~~

次に y 方向に 640 絵素分 2 μ m \times 640 = 1.28 mm と大きく移動し、上記の動作を繰り返す。この大きな移動を 10 回繰り返せば 6400 \times 6000 絵素が約 40 ~ 50 秒で検出されることになる。即ち 2 μ m の解像度で 6000 \times 6000 絵素の像をダイナミックレンジが 2 の 16 乗で、最小検出強度が数フォトンの蛍光検出や微弱光検出が 1 分以内で実現する。

~~{ 0 0 5 8 }~~

上記の実施例では 1 絵素あたりに要求される検出時間が短い場合であるが、1 桁以上大きく、かつ同じように 2 の 16 乗のダイナミックレンジが必要な場合には図 ^{178B} 9 の (b) に示す飽和時間を検出する方法は必要でなくなる。またフォトマルのフォトン検出パルスの幅が更に短くできればフォトンカウントのみ、或いはフォトンカウントとアナログ積分検出の組み合わせで検出できる。

~~{ 0 0 5 9 }~~

DNA 検査特に DNA チップを用いる DNA 検査を集団検診等の多数のサンプルを扱う用途に適用しようとする高感度、高分解能、広ダイナミックレンジでかつ高速の検査装置を実現することが重要になる。上記の実施例で説明したマルチスポットもしくはシート状ビームを用いて、同時に複数の絵素を蛍光検出し、励起光とサンプルの相対位置を走査により変化させ次々と蛍光検出していくこと

ファイル名 = D00005301A1.e1

によりこれが可能になった。

~~{0060}~~

6000×6000の絵素を64 (M=64) 絵素同時に検出することにより、(300マイクロ秒/絵素)以下の時間で検出することで、即ち平均絵素検出時間が(300マイクロ秒/M)以下で検出することができるようになり、一サンプル当たり3分以下で検出が可能になった。従来上記の絵素数の蛍光像を検出するのに10分以上要していたので高速検査の需要に応えうる。更にフォトンカウントとアナログ積分を併用することにより50マイクロ秒/絵素の時間で検出可能になり、1分以下で検出可能になる。

~~{0061}~~

更に、上記のマルチスポットを用いる蛍光検出でサンプル上のマルチスポット径を小さくすることにより、多数のMの直径が3 μmより小さく0.3 μmより大きい微小なスポットからなるマルチスポット励起光、又は絞り込み幅が3 μmより小さく0.3 μmより大きいシート状の励起光を照射する。これにより得られる各マルチスポットまたはシート状の照射位置からの蛍光を励起光から分離し、該サンプルから発する蛍光像を複数の微弱光検出素子で検出する。各検出素子から得られる信号を個別に記憶し、上記マルチスポット光またはシート状励起光とサンプルとの位置を相対的に変化させ、上記信号を順次記憶して行く、このようにすればサンプル上の所望の範囲に亘り信号が記憶収集でき、収集データから蛍光画像を構成することによりDNAを検査することが可能になる。このような方法を用いると、検出像の分解能が高くなる。この高い分解能を用いれば例えばサンプルとして所望のターゲットDNAに蛍光を付加しておき、細胞中の1本鎖DNAのうち対応するDNAにハイブリダイズさせることにより細胞中の目標とするDNAを蛍光像として検出することができ、細胞のDNA検査が可能になる。

~~{0062}~~

図179は本発明の蛍光検出の実施例図であり、特にDNA検査に有効な蛍光検出の実施例である。図27と同一番号は同一物を表す。図27で示された10絵素おきに照射するマルチスポット光に代え、シート状の励起光2000を用いている

ファイル名 = D00005301A1.e1

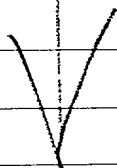
。励起光の照射で得られる蛍光は図⁷⁰の光学系同様にして励起光から分離して1次元のフォトマルアレイ、或いは超高感度1次元センサで検出される。シート状のビームでの励起は例えば隣り合う1次元方向の50絵素に亘り同時に行われ、1次元の高感度センサで同時に検出される。y方向に長いシート状のビームに直交するx方向例えば500画素分にスキャンすることにより、50×500絵素分の蛍光像が得られる。次にy方向に50絵素分移動し、上記の1走査を行う。これを10回繰り返せば、最終的には500×500絵素の蛍光画像が得られる。本実施例では孤立した、或いは隔たって分離したスポット光を照射する前記の実施例に比べ若干背景ノイズが大きくなるが、2次元平面的に大きく照射する場合に比べ、ノイズが小さい蛍光検出を行うことが可能である。フォトマル又は超高感度1次元センサから得られる信号は微弱光であるのでフォトンカウント検出を行う。

~~(0 0 0 0)~~
図⁸⁰は蛍光検出、或いは蛍光検出を用いるDNA検査のマルチスポット励起光発生方法を示す実施例である。レーザ⁹27はレーザ媒体が封入されたレーザチューブ271の両端はブリュースタ角の窓があり、ここから出たレーザ光は両端にある100%反射ミラー272及び273で折り返される。この共振器ミラーの間を往復するレーザ光は通常レーザの共振器内の光エネルギーから出射窓を脱げて共振器が外に取り出されるビームのエネルギーの10倍以上になっている。この共振器内にマルチスポット又はシートビーム発生ホログラム板270を挿入すると、ホログラム2701はマルチスポット、またはシート状ビームが発生するように予め作られているため、図に示すようにレンズ274を介してマルチスポット2702が再生される。なおホログラムに照射したレーザ光は約10%の回折効率でマルチスポット像を形成する。残りの光は0次光としてそのまま透過し、共振器内を往復する。このマルチスポットは図⁷⁰で説明したマスク状の円開口アレイ透過直後のマルチスポット光と全く同一のスポットであるため、レンズ²24を用いて図⁷⁰の構成により検査対象にマルチスポットを照射することが可能になる。この結果従来のレーザ出射光路中にホログラムを配置する場合に比べ、10倍近い強度のマルチスポット光もしくはシート状ビームが得られ、高速高感

度の蛍光検出、並びにDNA検査を行うことが可能になる。

~~[0064]~~

上記の実施例では励起光として1つの波長の場合について説明したが、本発明は励起光として2波長、或いは3波長以上を励起光として用いる場合にも効果を発揮する。この場合には、従来複数波長で検出しようとするとは非常に長い時間を要してしまうが、本発明のマルチスポット光を用いてフォトンカウント検出を行えば高感度、高速に検出することができる。



ファイル名 = D99007021A1.e1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 DNA検査方法及びDNA検査装置

【特許請求の範囲】 We claim:

1. ~~請求項1~~ 複数の種類からなる所望のDNA断片を予め決められた一定の規則に基づき配列した微小エリアである複数Lのセルから構成されているDNAチップに、検査対象であるDNAから前処理により作成したDNA断片に所望の蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイゼーションした被検査DNAチップに所望の波長からなる励起光を照射し、得られる蛍光を分析するDNA検査方法において、上記各セルの寸法D以下のスポット径dである複数Mのマルチスポット励起光を互いに異なる位置に蛍光減衰時間以上の時間 Δt に亘り対物レンズを用いて同時に照射し、得られる蛍光を蛍光検出光路に導き、上記DNAチップへのマルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出し、蛍光の位置と強度から被検査DNAチップの検査を行うDNA検査方法。

2. ~~請求項2~~ 複数Mの励起光スポットは1次元もしくは2次元状に一定ピッチで直線上に配列していることを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

3. ~~請求項3~~ 上記スポット径は上記セル寸法の整数Nに対しほぼ $1/N$ であることを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

4. ~~請求項4~~ 上記Nを2以上にしセルを複数の部分に分割し、1セル内にある N^2 個のデータの有意なデータのみを選択し、処理することにより正確な検査を行うことを特徴とする請求項3記載のDNA検査方法。

5. ~~請求項5~~ DNAチップの全検査対象サンプル点数 LN^2 に対し、 $LN^2 / (6 \times 10^5)$ 秒以内の時間で蛍光検出することを特徴とする請求項1乃至4の何れかに記載のDNA検査方法。

6. ~~請求項6~~ 上記DNAチップへの複数Mの照射スポットはスポット径d、整数kに対しほぼkdの間隔を持って直線上に配列し、当該スポットアレイを上記 Δt 時間照射後、ほぼdだけアレイ方向に移動し、 Δt 時間照射することを順次k回繰り返すことにより、アレイ方向にkM個のスポット位置に亘り検査を行い、かつDNAチップと対物レンズを少なくともアレイと直角方向に、相対的に

ファイル名 = D99007021A1.el

移動することによりDNAチップの所望の2次元領域を検査することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

~~7.~~
~~【請求項7】~~ 上記整数kは2以上であることを特徴とする請求項6記載のDNA検査方法。

~~8.~~
~~【請求項8】~~ 上記整数kは5以上であることを特徴とする請求項6記載のDNA検査方法。

~~4.~~
~~【請求項9】~~ 上記スポットアレイのアレイ方向の移動と同期させ、励起光により生じた蛍光が上記受光開口上のほぼ同一箇所に来るように蛍光検出光路内に蛍光検出偏向手段を具備した請求項1、~~6、7、8~~の何れかに記載のDNA検査方法。

~~5.~~
~~【請求項10】~~ 上記蛍光検出偏向手段は励起光を透過させ、蛍光を反射させる波長選択ビームスプリッタで構成されていることを特徴とする請求項~~9~~⁴記載のDNA検査方法。

~~6.~~
~~【請求項11】~~ 励起光路から分離された蛍光検出光路内に蛍光のみを透過し励起光を遮光するフィルタを有することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

~~12.~~
~~【請求項12】~~ 上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの瞳上でほぼ同一位置Aを通過し、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの瞳上の位置B'に達するように構成し、当該対物レンズの瞳上にあるB'の位置、もしくは蛍光検出光路内にあり上記対物レンズの瞳と共役な面上のB'の像位置、に反射励起光を遮光する手段を具備したことを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

~~13.~~
~~【請求項13】~~ 上記M個のマルチ励起スポット光が上記対物レンズの瞳上でほぼ同一位置Aを通過し、DNAチップで正反射した当該励起光が対物レンズの瞳上の上記Aとは異なる位置Bを通過するように構成し、当該対物レンズの瞳もしくは、蛍光検出光路内で対物レンズの瞳と共役な位置にBを中心に所望の径の反射励起光を遮光する部材を配置することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

ファイル名 = D99007021A1.e1

14.
【請求項14】 上記反射励起光は正反射励起光であり、DNAチップ内の異物から散乱した励起光を上記遮光手段又は遮光部材外から取り出し、更に上記蛍光検出光路から分岐し、DNAチップの照射スポットと共役な位置で撮像し、当該撮像情報を用いて、上記マルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出した情報を補正することを特徴とする請求項12または13の何れかに記載のDNA検査方法。

15.
【請求項15】 上記M個のマルチ励起スポット光は複数のレーザ光源により形成したことを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

16.
【請求項16】 上記複数のレーザ光源より出射した光を光ファイバに導入し、M個の所望のピッチで整列した当該光ファイバの出射端から出射することによりM個のマルチ励起スポット光を得ることを特徴とする請求項15記載のDNA検査方法。

17.
【請求項17】 上記マルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出する手段は超高感度の $N_x \times N_y$ 画素数からなる2次元撮像装置であり、スポット径dの励起光を n_x 、 n_y を整数とし、x方向に $n_x d$ 、y方向に $n_y d$ のピッチで $N_x \times N_y$ スポット同時に照射し、得られる $N_x \times N_y$ 画素数からなる蛍光スポット像を該超高感度2次元撮像装置で検出し、DNA検出装置とDNAチップをピッチdで相対的にxy方向に $n_x \times n_y$ ステップ移動することによりDNAチップの所望の領域を検出することを特徴とする請求項1記載のDNA検出方法。

18.
【請求項18】 上記励起光は複数の異なる波長からなり、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して検出することを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

19.
【請求項19】 上記複数の波長からなる励起光を同時に照射し、複数の蛍光体を付加した異なるターゲットを分離して同時に検出することを特徴とする請求項18記載のDNA検査方法。

20.
【請求項20】 上記被検査DNAチップの所望の蛍光体を付加したターゲットをハイブリダイゼーションした検査面上に、上記励起スポット光の近傍に第2の光を斜め入射させ、該検査面で反射した光の位置を検出することにより、焦点

出願書類

~~ページ(6 / 71)~~

ファイル名 = D99007021A1.el

検出し、この情報に基づき検査面と上記対物レンズの相対距離を制御することにより焦点合わせを行うことを特徴とする請求項1記載のDNA検査方法。

¹²
【請求項2-1】励起光源からの励起光をDNAチップに照射する励起光照射系と、DNAチップ上の蛍光体から発生した蛍光を検出する蛍光検出系からなるDNA検査装置において、DNAチップ上に多数あるセルの寸法D以下のスポット径dを有する複数Mの励起光をDNAチップ上に同時に発生せしめるマルチスポット励起光発生光学系と、当該マルチスポット光をDNAチップ上のDNA断片に付加した蛍光物体に同時に上記寸法dで照射せしめる対物レンズと、得られる蛍光を当該対物レンズを介して蛍光検出光路に導くビームスプリッタと、上記マルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出する蛍光検出手段と、DNAチップの所望の領域に亘りマルチスポット光を照射し蛍光検出するように上記マルチスポット光の位置とDNAチップの位置を相対的に変化せしめ駆動手段と、当該駆動手段並びに蛍光検出手段により検出されたDNAチップの所望領域の蛍光強度と蛍光位置から被検査DNAチップのDNA情報を求め、検査する制御系からなることを特徴とするDNA検査装置。

¹³
【請求項2-2】上記マルチスポット励起光発生光学系は1次元もしくは2次元状に一定ピッチで直線上に配列している複数Mの励起光スポットを同時に発生することを特徴とする請求項¹²記載のDNA検査装置。

²³
【請求項2-3】上記スポット径は上記セル寸法Dの整数Nに対しほぼ $1/N$ であることを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

²⁴
【請求項2-4】上記Nを2以上にしセルを複数の部分に分割し、1セル内にある N^2 個のデータの内有意なデータのみを選択し、処理する上記制御系を有することを特徴とする請求項22又は23の何れかに記載のDNA検査装置。

²⁵
【請求項2-5】上記DNAチップの全検査対象サンプル点数 LN^2 に対し、 $LN^2 / (6 \times 10^5)$ 秒以内の時間で蛍光検出することを特徴とする請求項24記載のDNA検査装置。

²⁶
【請求項2-6】上記蛍光検出手段は上記DNAチップへの複数Mの照射スポットと共役な関係にある面上に形成されるスポット像の径とほぼ同程度の有効径を有するM個の受光開口有することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

ファイル名 = D99007021A1.e1

置。

27
【請求項27】上記照射スポット像とほぼ同程度の有効径を有するM個の受光開口は光ファイバ受光端であり、該ファイバの出射端より出射する光を分離して検出する蛍光検出手段であることを特徴とする請求項26記載のDNA検査装置。

14
【請求項28】上記DNAチップへの複数Mの照射スポットはスポット径d、整数kに対しほぼkdの間隔を持って直線上に配列し、当該スポットアレイを上記Δt時間照射後、ほぼdだけアレイ方向に移動し、Δt時間照射することを順次k回繰り返すことにより、アレイ方向にkM個のスポット位置に亘り検査を行い、かつDNAチップと上記対物レンズを少なくともアレイと直角方向に、相対的に移動することによりDNAチップの所望の2次元領域を検査する上記制御系を有することを特徴とする請求項21記載のDNA検査装置。

29
【請求項29】上記スポットアレイの移動は音響光偏向器を用いて行うことを特徴とする請求項28記載のDNA検査装置。

30
【請求項30】上記整数kは2以上であることを特徴とする請求項28記載のDNA検査装置。

31
【請求項31】上記整数kは5以上であることを特徴とする請求項28記載のDNA検査装置。

15
【請求項32】上記スポットアレイはマイクロレンズアレイで形成することを特徴とする請求項21、28又は29の何れかに記載のDNA検査装置。

16
【請求項33】上記スポットアレイはホログラムで形成することを特徴とする請求項21、28又は29の何れかに記載のDNA検査装置。

17
【請求項34】上記スポットアレイのアレイ方向の移動と同期させ、励起光により生じた蛍光が上記受光開口上のほぼ同一箇所に来るよう構成された偏向手段を具備した請求項21記載のDNA検査装置。

35
【請求項35】上記偏向手段は励起光を透過させ、蛍光を反射させる波長選択ビームスプリッタで構成されていることを特徴とする請求項34記載のDNA検査装置。

ファイル名 = D00000201A1.el

れたマルチスポット光を励起光として蛍光体を付加したDNAを含む被観測物体に投射し、該投射により被検査物体で発生した蛍光を前記被検査物体で反射した前記励起光から分離し、前記投射スポットで発生する蛍光が結像する位置に検出器を配置することにより各マルチスポット光を投射した位置で発生した蛍光を検出し、該蛍光を検出した位置と検出信号強度の情報からDNAを検査することを特徴とするDNA検査方法。

64
〔請求項18〕

請求項47から18の何れかに記載のマルチスポット光形成方法を用いて形成されたマルチスポット光を励起光として蛍光体を付加したDNAを含む被検査物体に投射し、該投射により前記被検査物体で発生した蛍光を前記被検査物体で反射した前記励起光から分離し、該蛍光を該蛍光が結像する位置に配置した複数の開口部を通過せしめ、各開口部を通過した蛍光を個別に検出することにより前記マルチスポット光を投射した位置の蛍光強度を検出することを特徴とするDNA検査方法。

65
〔請求項19〕

上記蛍光を励起光から分離する方法は、波長分離ビームスプリッタを用いると共に、各マルチスポット光による励起で発生する蛍光が結像光学系から結像位置に至る各スポットからの蛍光の主光線が互いに平行となるテレセントリック結像光学系にし、該結像光学系と結像位置の間に干渉フィルタ又は及び波長分離ビームスプリッタを挿入する方法であることを特徴とする請求項17または18に記載のDNA検査方法。

18
〔請求項20〕

レーザ光源から発射したレーザビームを分岐させて8以上のビームを形成し、該分岐させて形成した8以上のビームをDNAチップの検査面に照射し、該照射により前記DNAチップから発生する蛍光を前記8以上に分岐して照射したそれぞれのビームに対応させ該ビームの反射光から分離して検出し、該それぞれのビームに対応させて検出した蛍光の情報に基づいてDNAチップを検査することを特徴とするDNA検査方法。

1
[[請求項¹⁹21]]

レーザ光源から発射したレーザビームを強度がほぼ等しい複数のビームに分岐し、該分岐した複数のビームの像をDNAチップの検査面上に投影し、該投影された複数のビームの像により前記DNAチップから発生する蛍光の像を撮像し、該撮像した蛍光の像の情報に基づいてDNAチップを検査することを特徴とするDNA検査方法。

[[請求項²⁰22]]

前記DNAチップと前記ビームとを、2次元的に相対的に移動させながら前記ビームを前記DNAチップに照射して前記DNAチップを検査することを特徴とする請求項¹⁹20又は²¹21に記載のDNA検査方法。

[[請求項²¹23]]

前記分岐させたビームを2次元的に配置して前記DNAチップに照射することを特徴とする請求項¹⁹20又は²¹21に記載のDNA検査方法。

↓

ファイル名 = D00005301A1.el

87
〔請求項4〕

上記マルチスポットまたはシート状の励起光と対象物の相対位置変化は対象物面内方向と対象物体面に垂直な方向の計3方向の内少なくとも1方向とすることにより、2次元又は3次元の蛍光画像を検出することを特徴とする請求項1または2に記載の蛍光画像検出方法。

88
〔請求項5〕

上記マルチスポット励起光またはシート状励起光と対象物の相対位置変化を行い、1絵素分の移動をおこなう周期 T_d を上記フォトンカウント信号の単独フォトン検出時のパルス幅 Δt_0 で割った値に1以下の所望の係数 α を掛けた値以上に上記フォトンカウント数 N_{pm} が達していることを判断基準にして、上記マルチスポット励起光またはシート状励起光の強度を変化せしめるか、蛍光検出強度が小さくなるようにすることを特徴とする請求項1または2に記載の蛍光画像検出方法。

89
〔請求項6〕

上記マルチスポット光またはシート状励起光は2波長以上の多色光であることを特徴とする請求項1または2に記載の蛍光画像検出方法。

90
〔請求項7〕

上記フォトンパルス信号がハイレベルにある時間を上記相対的な位置変化に伴う1絵素分の検出時間 T_d 以内の時間 βT_d に亘り加算計測した値 $T_{h'}$ が1以下の所定の γ に対し、 $T_{h'} \geq \gamma \beta T_d$ の条件を満たすとき、上記検出素子の出力信号をアナログ的に積分する回路で積算した信号を用いることにより強い蛍光信号に対しても検出可能にする請求項1または2に記載の蛍光画像検出方法。

22
〔請求項8〕

蛍光分子が付加されたDNA断片を対応するDNAに結合させたサンプルに励起光を照射し、蛍光を検出するDNA検査方法において、上記サンプルに多数Mの微小なスポットからなるマルチスポット励起光を照射することにより得られる各マルチスポットからの蛍光を励起光から分離し、該サンプルから発する蛍光像をフォトンカウント可能な複数の微弱光検出素子で検出し、各検出素子から得られるフォトン信号をそれぞれ個別にフォトンカウントし、各検出素子で検出され

ファイル名 = D00005301A1.e1

たフォトンカウント数 N_{pm} を個別に記憶し、上記マルチスポット光と該サンプルとの位置を相対的に変化せしめて上記各検出器のフォトンカウント数を順次記憶して行き、上記サンプル上の所望の範囲に亘りフォトンカウント数データを記憶収集し、当該収集データから蛍光画像を構成し、DNA検査することを特徴とするDNA検査方法。

23
[請求項9]

蛍光分子が付加されたDNA断片を対応するDNAに結合させたサンプルに励起光を照射し、蛍光を検出するDNA検査方法において、上記サンプルにシート状の励起光を照射することにより得られる長細い形状を有する照射領域からの蛍光を励起光から分離し、該サンプルから発する蛍光像をフォトンカウント可能な複数の微弱光検出素子で検出し、各検出素子から得られるフォトン信号をそれぞれ個別にフォトンカウントし、各検出素子で検出されたフォトンカウント数 N_{pm} を個別に記憶し、上記シート状励起光による細長い形状を有する照射領域と該サンプルとの位置を相対的に変化せしめて上記各検出器のフォトンカウント数を順次記憶して行き、上記サンプル上の所望の範囲に亘りフォトンカウント数データを記憶収集し、当該収集データから蛍光画像を構成し、DNA検査することを特徴とするDNA検査方法。

93
[請求項10]

上記サンプルはDNAチップであることを特徴とする請求項8または9に記載のDNA検査方法。

94
[請求項11]

上記DNAサンプルに照射されるマルチスポット励起光又はシート状の励起光の最小絞り径となる位置にある物体面からの蛍光像の合焦点位置にマルチスポット又はシート状の励起光像のみを通過せしめるマルチスポット開口または細長い開口を配置し、共焦点検出することを特徴とする請求項8または9に記載のDNA検査方法。

24
[請求項12]

上記Mは10以上であることを特徴とする請求項8記載のDNA検査方法。

ファイル名 = D00005301A1.e1

25
[[請求項 1-3]]

上記Mは50以上であることを特徴とする請求項 24 記載のDNA検査方法。

26
[[請求項 1-4]]上記マルチスポットは1又は2次元の直線上に配列していることを特徴とする
請求項 22 記載のDNA検査方法。98
[[請求項 1-5]]

上記マルチスポット光またはシート状励起光とDNAサンプルとの1絵素分の
相対位置変化を行う周期 T_d を上記フォトンカウント信号の単独フォトン検出時
のパルス幅 Δt_0 で割った値に1以下の所望の係数 α を掛けた値以上に上記フォ
トンカウント数 N_{pm} が達していることを判断基準にして、上記マルチスポット
励起光またはシート状励起光の強度を変化せしめるか、蛍光検出強度が小さくな
るようにすることを特徴とする請求項 91 または 92 記載のDNA検査方法。

27
[[請求項 1-6]]上記マルチスポット光またはシート状励起光は2波長以上の多色光であること
を特徴とする請求項 22 記載のDNA検査方法。100
[[請求項 1-7]]

上記フォトンパルス信号がハイレベルにある時間を1絵素分の検出時間 T_d
内の時間 βT_d に亘り加算計測した値 $T_{h'}$ が1以下の所定の γ に対し、 $T_{h'}$
 $\geq \gamma \beta T_d$ の条件を満たすとき、上記検出素子の出力信号をアナログ的に積分す
る回路で積算した信号を用いることにより強い蛍光信号に対しても検出可能にす
る請求項 91 または 92 記載のDNA検査方法。

28
[[請求項 1-8]]

蛍光分子が付加されたDNA断片を対応するDNAに結合させたサンプルに励
起光を照射し、蛍光を検出するDNA検査方法において、多数Mの微小なスポッ
トからなるマルチスポット励起光又はシート状の励起光を照射することにより得
られる各マルチスポットまたはシート状の照射位置からの蛍光を励起光から分離
し、該サンプルから発する蛍光像を複数Mの微弱光検出素子で平均絵素検出時間
が(300マイクロ秒/M)以下で検出し、各検出素子から得られる信号を個別
に記憶し、上記マルチスポット光またはシート状励起光と該サンプルとの位置を

ファイル名 = D00005301A1.e1

相対的に変化せしめて上記信号を順次記憶して行き、上記サンプル上の所望の範囲に亘り上記信号を記憶収集し、当該収集データから蛍光画像を構成し、DNAを検査することを特徴とするDNA検査方法。

29
〔請求項1-9〕

蛍光分子を付加したDNA断片を対応するDNAに結合させたサンプルに励起光を照射し、蛍光を検出するDNA検査方法において、多数Mの直径が又は絞り込み幅が $3\mu\text{m}$ より小さく $0.3\mu\text{m}$ より大きい微小なスポットからなるマルチスポット励起光、 $3\mu\text{m}$ より小さく $0.3\mu\text{m}$ より大きい幅を有するシート状の励起光を照射することにより得られる各マルチスポットまたはシート状の照射位置からの蛍光を励起光から分離し、該サンプルから発する蛍光像を複数の微弱光検出素子で検出し、各検出素子から得られる信号を個別に記憶し、上記マルチスポット光またはシート状励起光と該サンプルとの位置を相対的に変化せしめて上記信号を順次記憶して行き、上記サンプル上の所望の範囲に亘り上記信号を記憶収集し、当該収集データから蛍光画像を構成することによりDNAを検査することを特徴とするDNA検査方法。

30
〔請求項2-9〕

励起光源と、蛍光分子が付加されたDNA断片を対応するDNAに結合させたサンプルを保持する機構と、該光源から出射する光を径がdで複数Mのマルチスポット励起光として該サンプル上に同時に発生させるマルチスポット励起光発生光学系と、当該マルチスポット励起光を該サンプル上のDNA断片に付加した蛍光物体に同時に上記寸法dで照射せしめる対物レンズと、得られる蛍光を当該対物レンズを介して蛍光検出光路に導くビームスプリッタと、上記マルチスポット励起光により発生した各マルチスポット光からの蛍光を分離して検出する蛍光検出手段と、当該蛍光検出手段で得られた各マルチスポット光からの蛍光のフォトンパルス信号を個別にフォトンカウントする回路からなるフォトンカウント手段と、該サンプルの所望の領域に亘りマルチスポット光を照射し蛍光検出するように上記マルチスポット光の位置とサンプルの位置を相対的に変化せしめる駆動手段と、当該駆動手段並びにフォトンカウント手段により検出されたサンプルの所望領域のフォトンカウント情報とフォトンカウント位置情報を保存する手段と、

ファイル名 = D00005301A1.e1

該フォトンカウント情報とフォトンカウント位置情報から被検査サンプルのDNA情報を求める手段とからなるDNA検査装置。

31
[[請求項2-1]]

励起光源と、蛍光分子が付加されたDNA断片に対応するDNAに結合させたサンプルを保持する機構と、該光源から出射する光を長径D、短径dのシート状の励起光を該サンプル上に発生せしめるシート状励起光発生光学系と、当該シート状励起光をサンプル上のDNA断片に付加した蛍光物体に短径が上記寸法dになるように照射せしめる対物レンズと、得られる蛍光を当該対物レンズを介して蛍光検出光路に導くビームスプリッタと、上記シート状の励起光により発生したシート状の光からの蛍光を分離して検出する蛍光検出手段と、当該蛍光検出手段で得られたシート状の光からの蛍光のフォトンパルス信号を個別にフォトンカウントする回路からなるフォトンカウント手段と、該サンプルの所望の領域に亘りシート状の光を照射し蛍光検出するように上記シート状の光の位置とサンプルの位置を相対的に変化せしめる駆動手段と、当該駆動手段並びにフォトンカウント手段により検出されたサンプルの所望領域のフォトンカウント情報とフォトンカウント位置情報を保存する手段と、該フォトンカウント情報とフォトンカウント位置情報から被検査サンプルのDNA情報を求める手段とからなるDNA検査装置。

105
[[請求項2-2]]

上記DNAチップに照射されるマルチスポット励起光またはシート状励起光の最小絞り径dとなる位置にある物体面からの上記対物レンズによる蛍光像の合焦点位置にマルチスポット像又はシート像のみを通過せしめるマルチスポット開口を配置し、共焦点検出することを特徴とする請求項2-0または2-1に記載のDNA検査装置。

32
[[請求項2-3]]

上記Mは10以上であることを特徴とする請求項2-0記載のDNA検査装置。

33
[[請求項2-4]]

上記Mは50以上であることを特徴とする請求項2-0記載のDNA検査装置。

ファイル名 = D00005301A1.e1

108
〔請求項25〕

上記マルチスポット光またはシート状励起光とDNAチップの相対位置変化を行う周期 T_d を上記フォトンカウント信号の単独フォトン検出時のパルス幅 Δt で割った値に1以下の所望の係数 α を掛けた値以上に上記フォトンカウント数 N_{pm} が達していることを判断基準にして、上記マルチスポット励起光の強度を変化せしめる手段を具備したことを特徴とする請求項20または21に記載のDNA検査装置。

34
〔請求項26〕

上記マルチスポット光またはシート状励起光を2波長以上の多色光とする、上記励起光源、上記マルチスポット発生光学系又はシート状励起光発生光学系、上記蛍光検出手段、並びに上記フォトンカウント手段とからなることを特徴とする請求項20または21に記載のDNA検査装置。

110
〔請求項27〕

上記フォトンパルス信号がハイレベルにある時間を1絵素分の検出時間 T_d 以内の時間 βT_d に亘り加算計測した値 $T_{h'}$ が1以下の所定の γ に対し、 $T_{h'} \geq \gamma \beta T_d$ の条件を満たすか否かを判断する手段と、上記検出素子の出力信号をアナログ的に積分する回路で積算する手段と、上記フォトンカウント手段により得られた結果と、当該アナログ的積分回路手段で得られた結果とを用いて当該絵素の蛍光検出結果を決定する手段を具備した請求項20または21に記載のDNA検査装置。

35
〔請求項28〕

レーザからなる励起光源と、蛍光分子が付加されたDNA断片を対応するDNAに結合させたサンプルを保持する機構と、当該レーザの共振器内にマルチスポット発生ホログラム又はシートビーム発生ホログラムを配置し、レーザ共振器内の強力なレーザ光でマルチスポットまたはシートビームを発生させるマルチスポットまたはシートビーム励起光発生光学系と、当該励起光を該サンプル上のDNA断片に付加した蛍光物体に照射せしめる対物レンズと、得られる蛍光を当該対物レンズを介して蛍光検出光路に導くビームスプリッタと、上記励起光により発生した蛍光を励起光から分離して検出する蛍光検出手段と、該サンプルの所望の

領域に亘り励起光を照射し蛍光検出するように上記励起光の位置とサンプルの位置を相対的に変化せしめる駆動手段と、当該駆動手段並びに蛍光検出手段により検出されたサンプルの所望領域の蛍光検出情報と蛍光検出位置情報を保存する手段と、該蛍光検出情報と蛍光検出位置情報から被検査サンプルのDNA情報を求める手段からなるDNA検査装置。

09078532.1004.00

ファイル名 = A00011581A1.e1

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ~~高密度DNAプローブアレイに対応する分布計測装置を提供する。~~

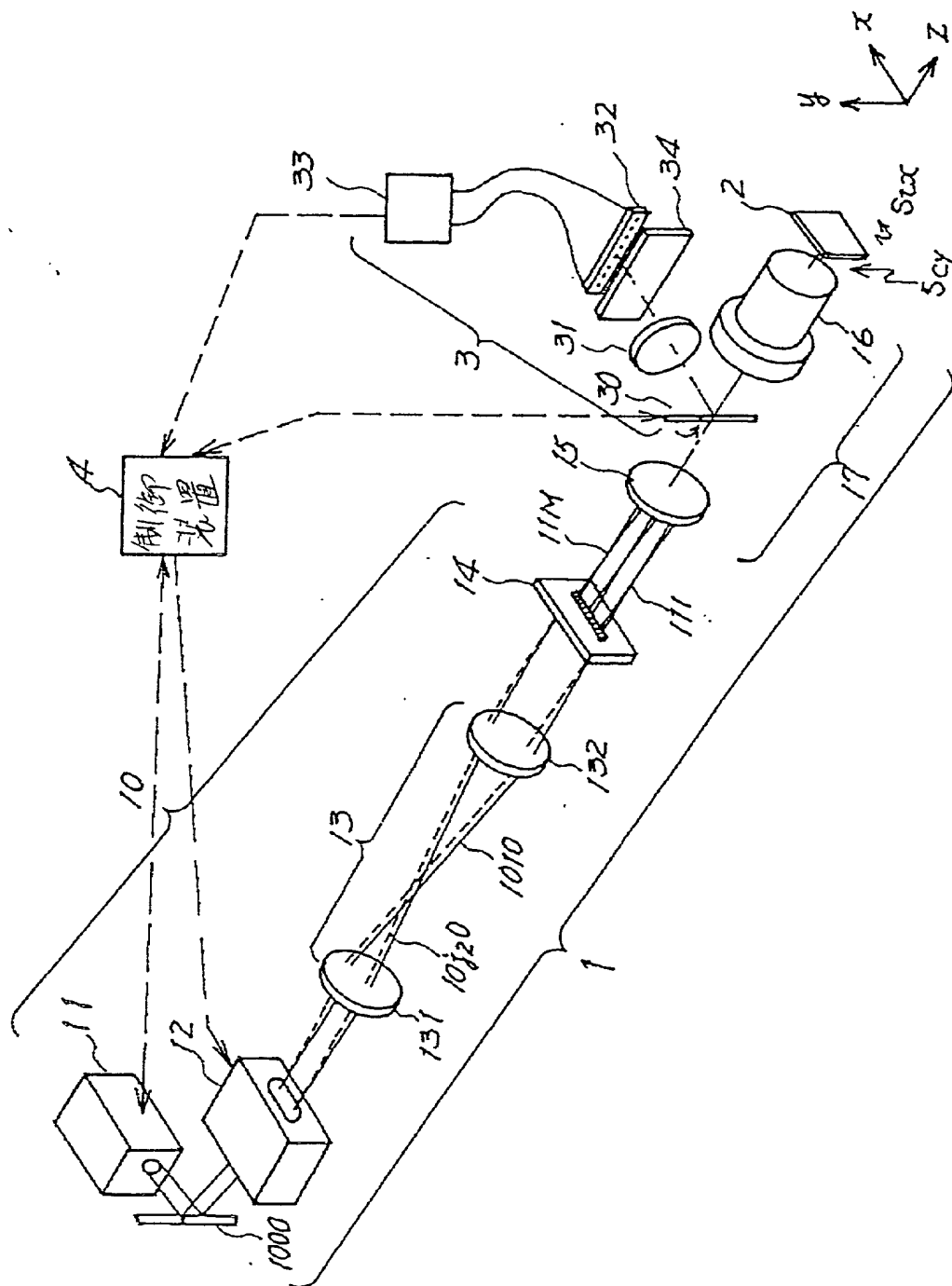
【解決手段】 ステージ~~2~~に載置したDNAプローブアレイ~~1~~上に複数の照射スポット~~101a, 101b,~~を形成し、ステージをXYに移動させて走査してDNAプローブアレイのほぼ全面を照射する。DNAプローブアレイ上の複数の照射スポット部より生じる複数の蛍光発光を集光し、マルチ検出器~~17~~により同時に検出し、検出した信号をデータ処理手段~~19~~で処理して画像を再構成する。

装置

【選択図】 図1

DNAチップの
検査方法及びその装置。

09678652.100400

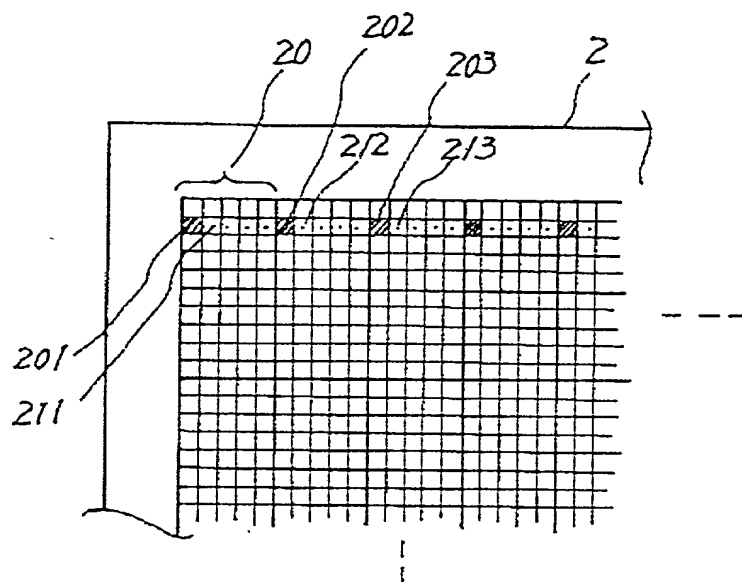


—
[X]

2020-21

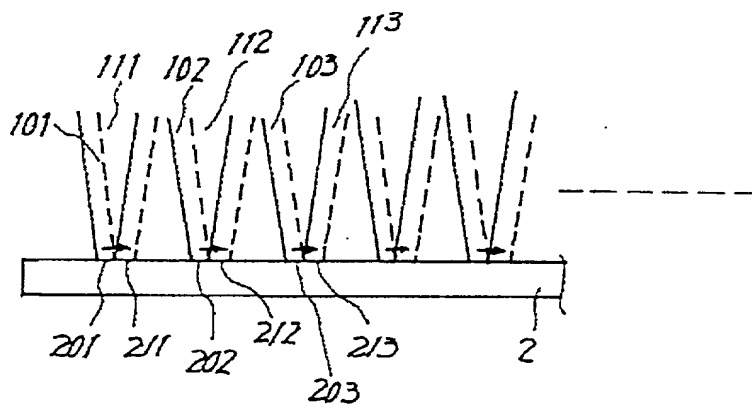
【図 2】

図 2



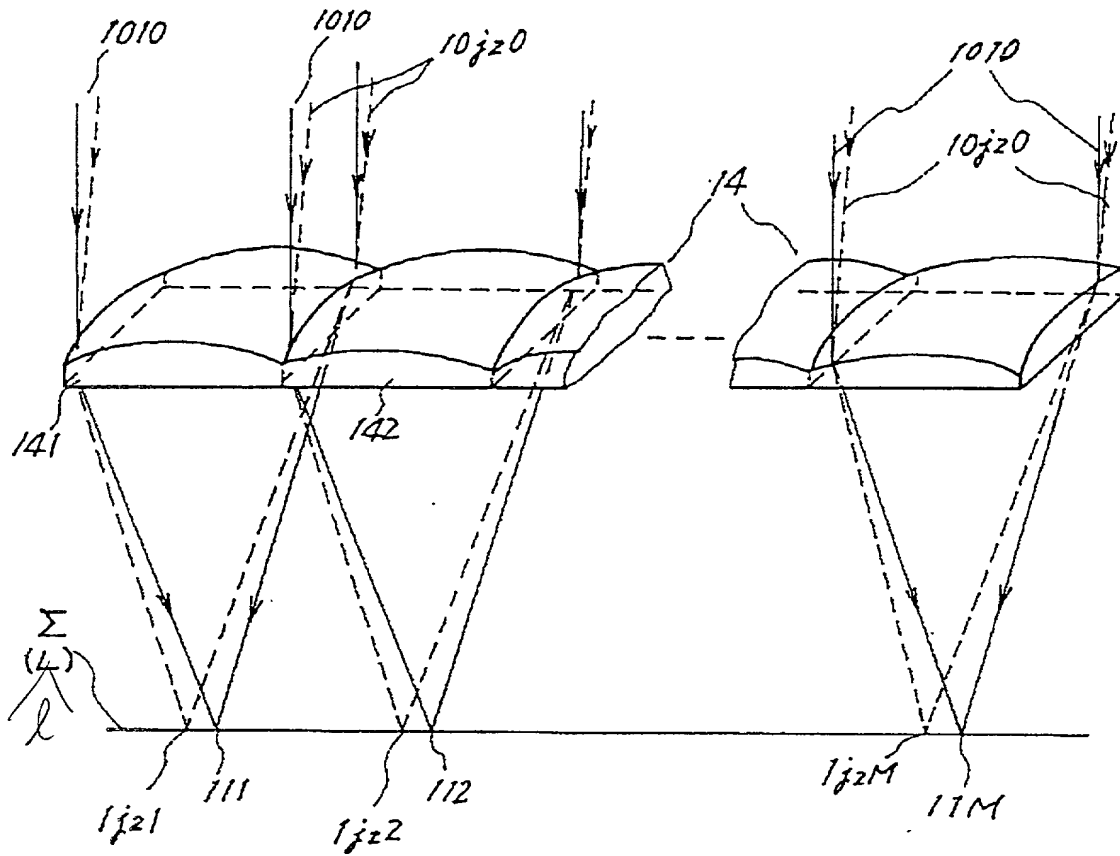
【図 3】

図 3



【図 4】

図 4

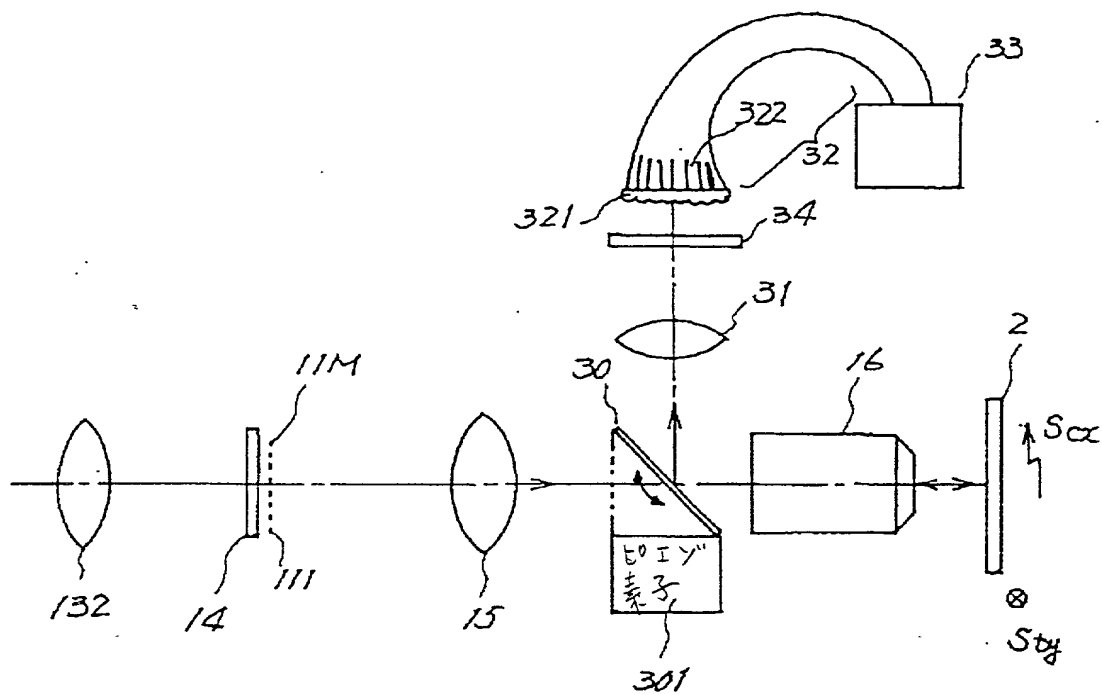


004001"2593/550

(一)

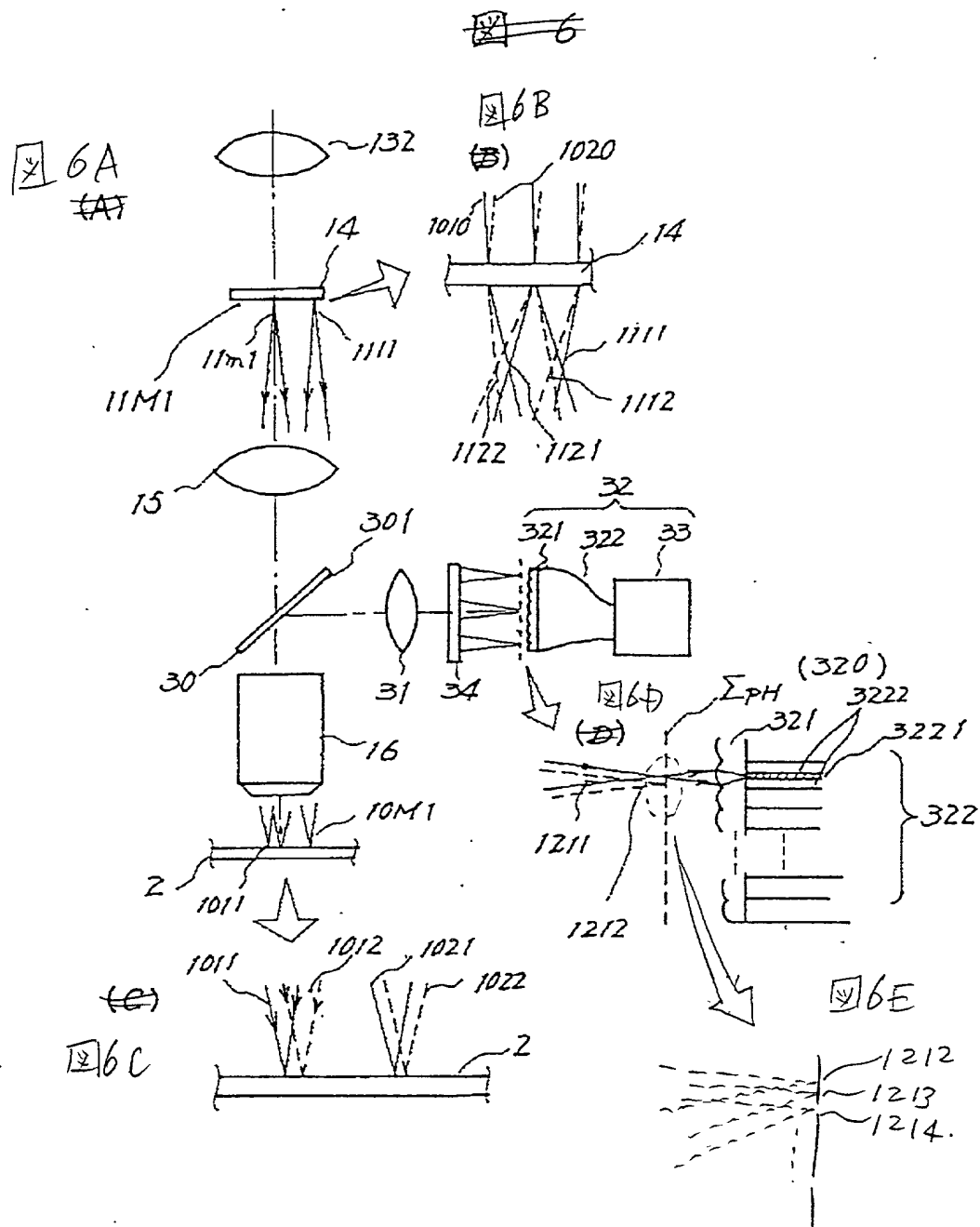
【図 5】

図 5



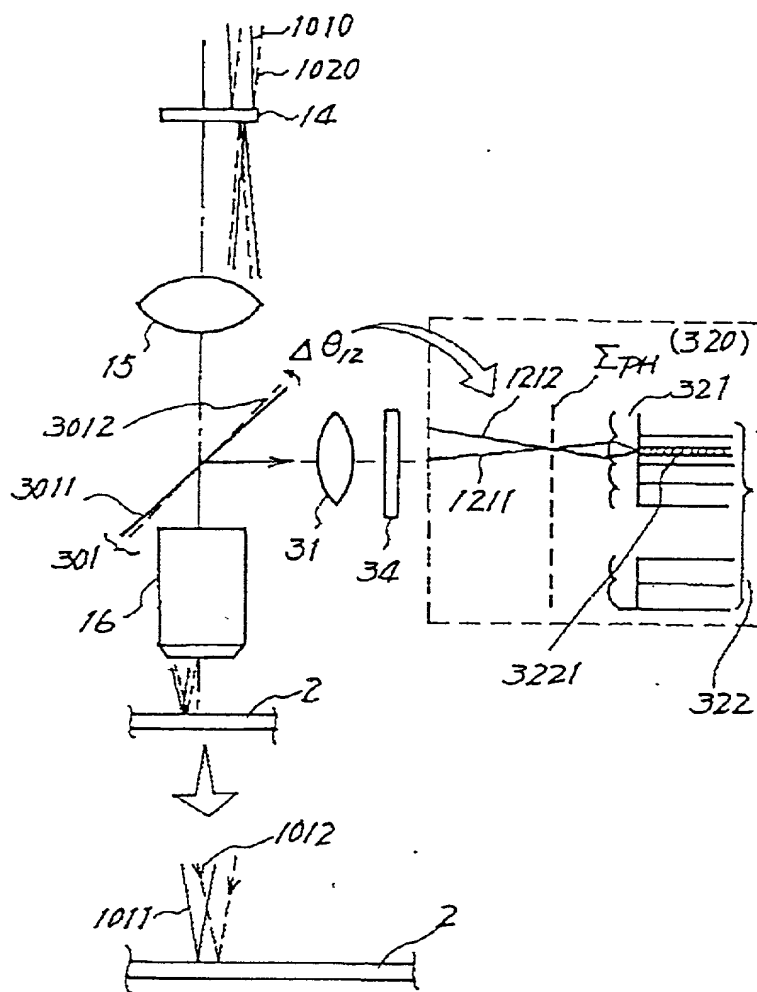
09070652.100400

〔図 8〕



【図7】

図 7



09678692.100400

~~図 8~~

~~図 8~~

図 8A

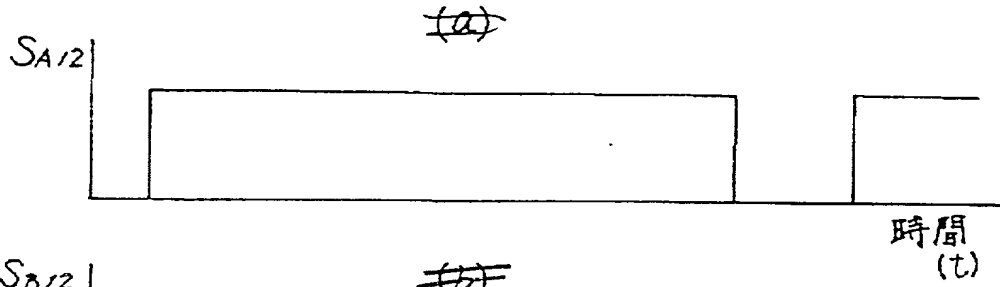


図 8B

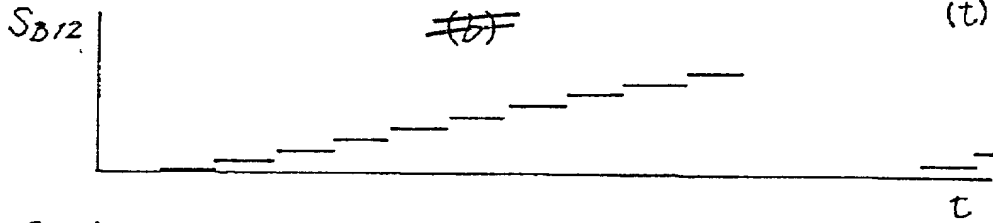


図 8C

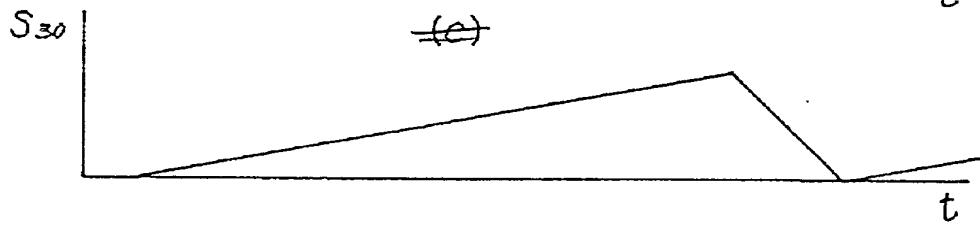


図 8D

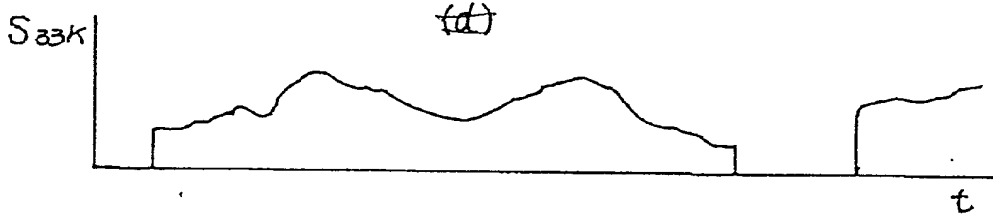


図 8E

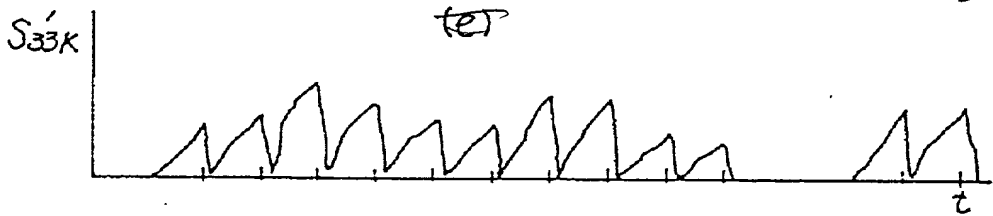
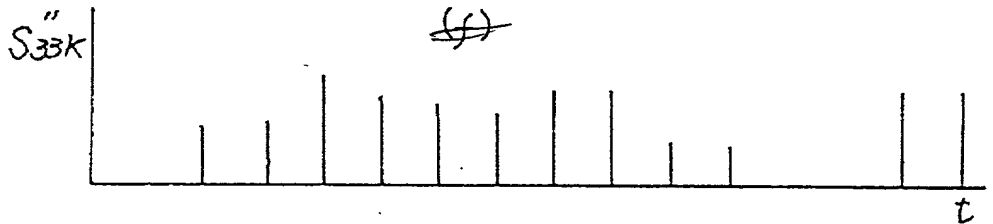


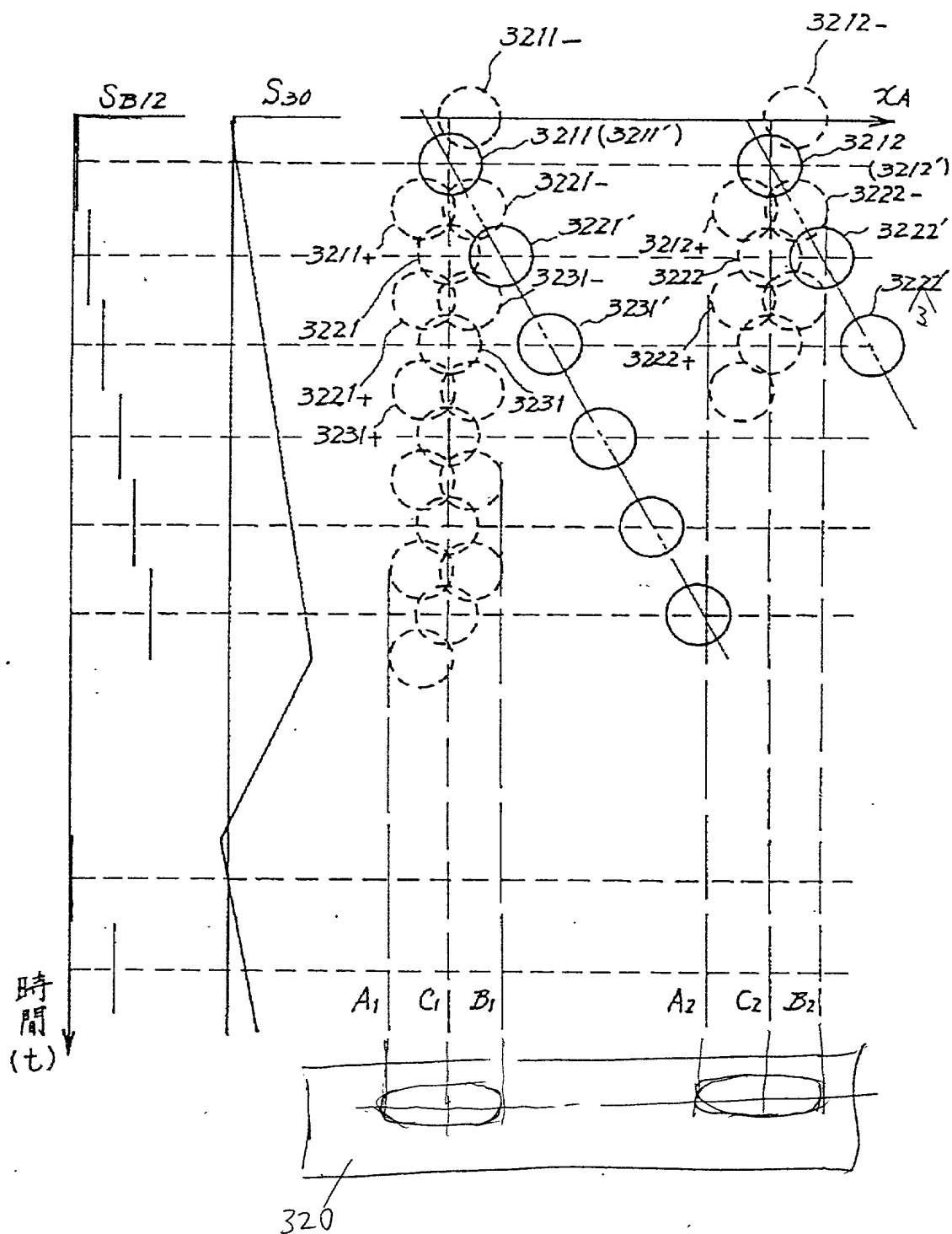
図 8F



09578652.100400

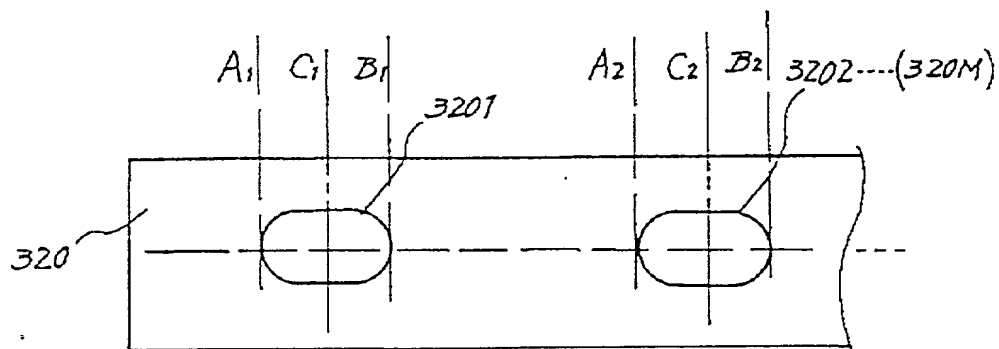
【図 9】

図 9



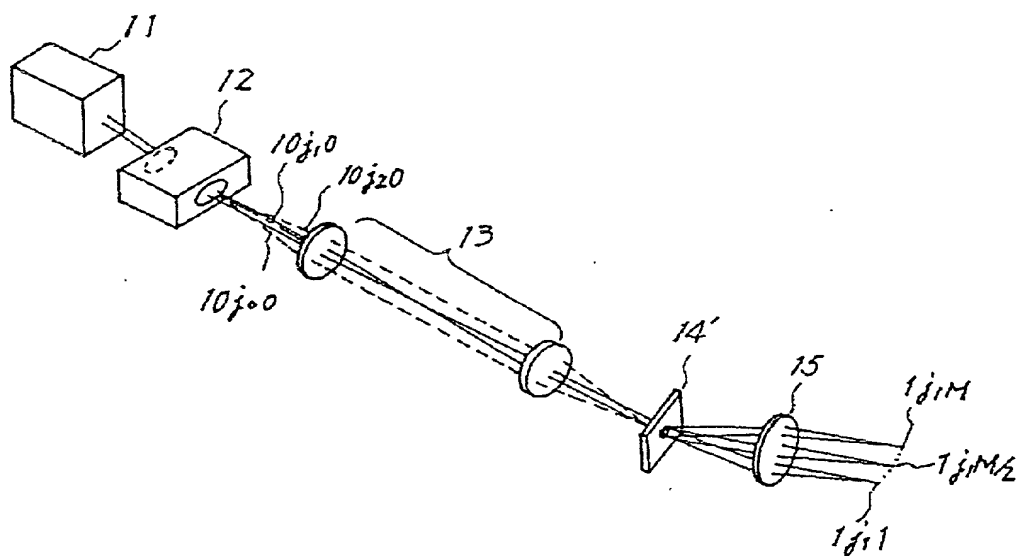
【図 10】

図 10



【図 11】

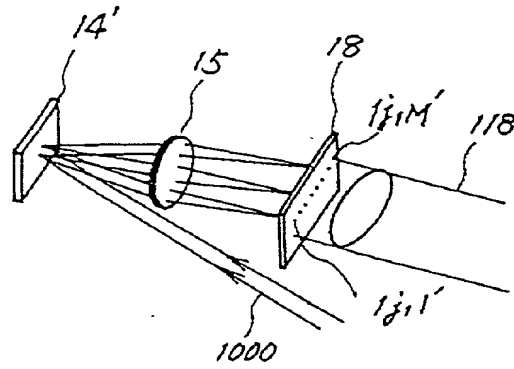
図 11



004001-2559/50

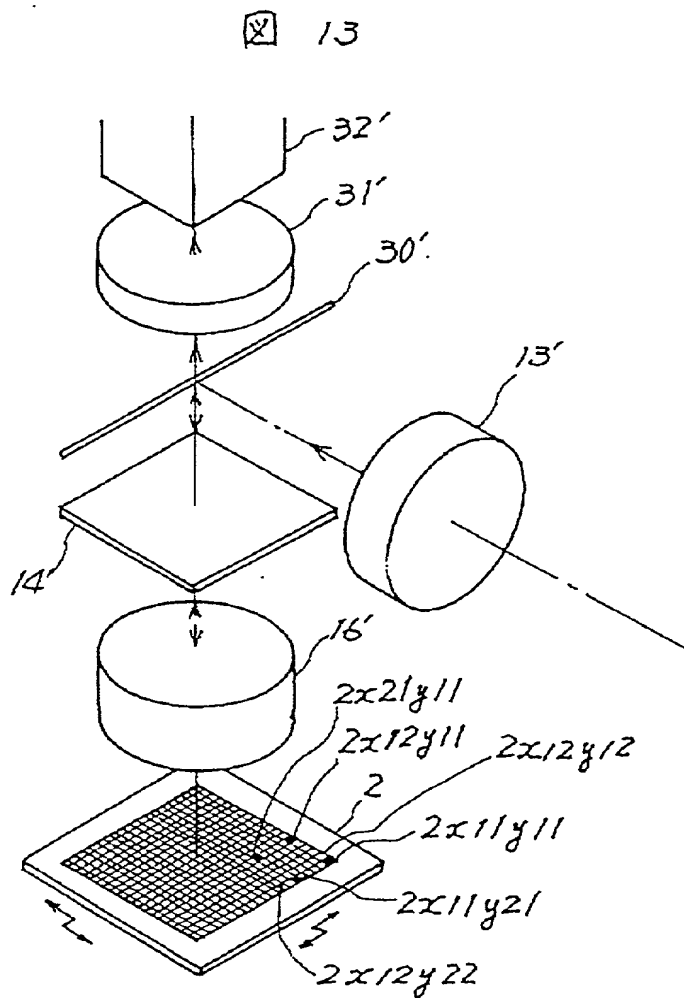
【図 12】

図 12

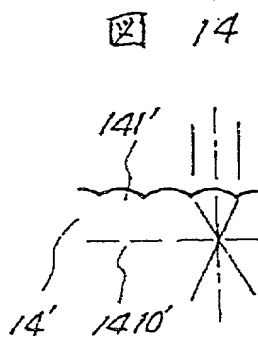


09678652, 100400

【図 13】

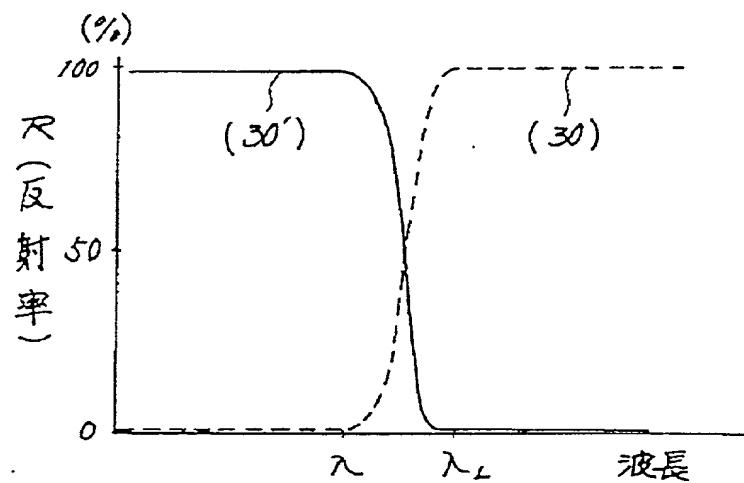


【図 14】



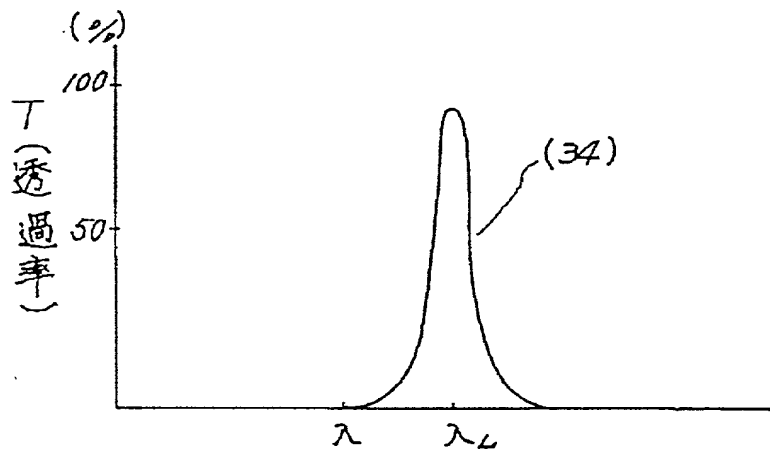
【図 15】

図 15



【図 16】

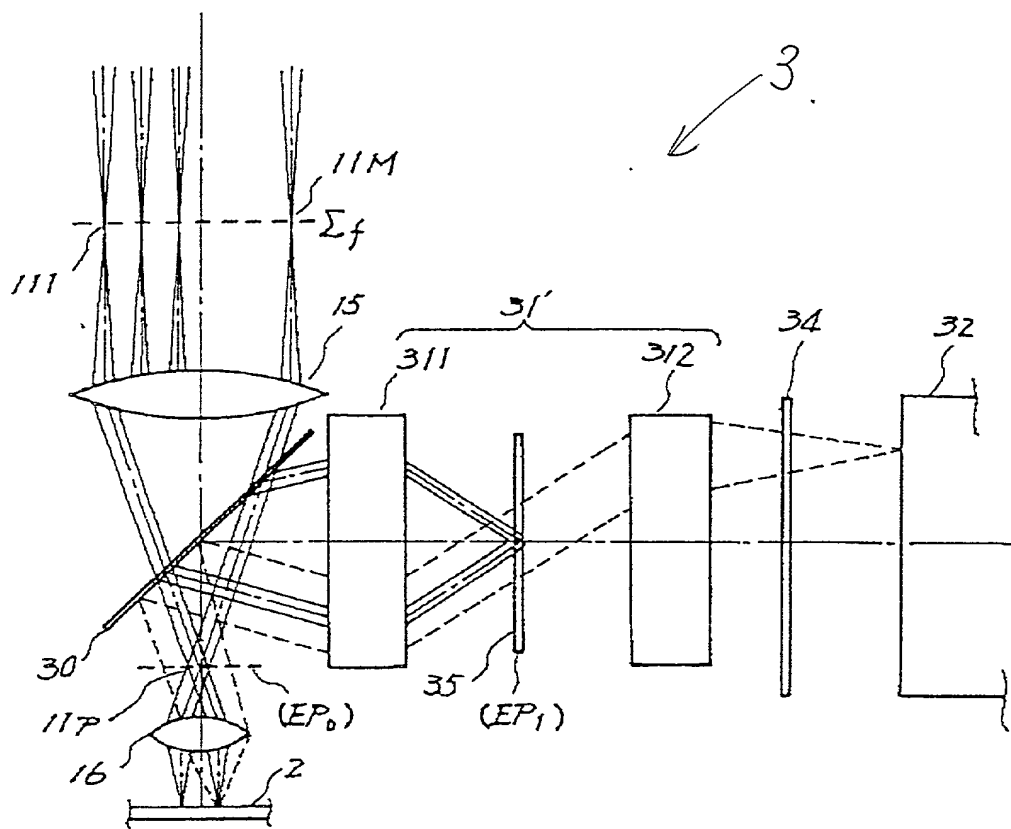
図 16



09678652-100400

【図 17】

図 17

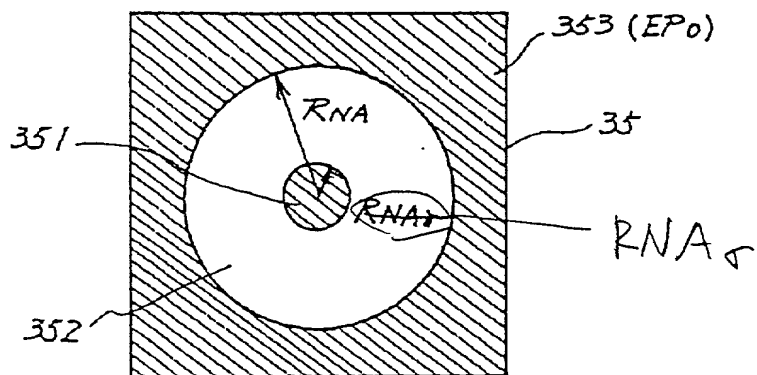


004001" 25982950

1

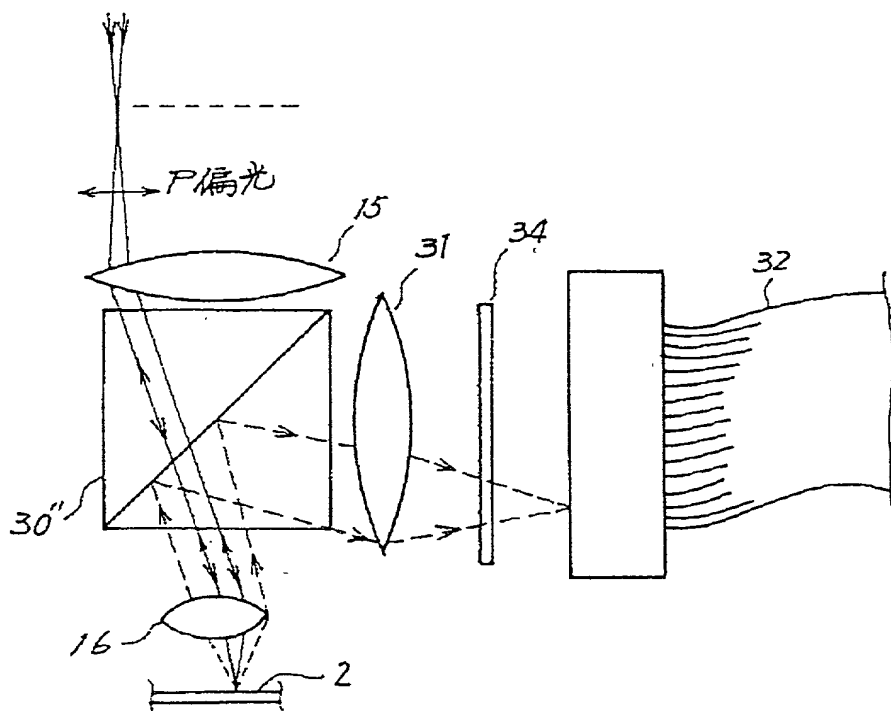
【図18】

図 18



【図19】

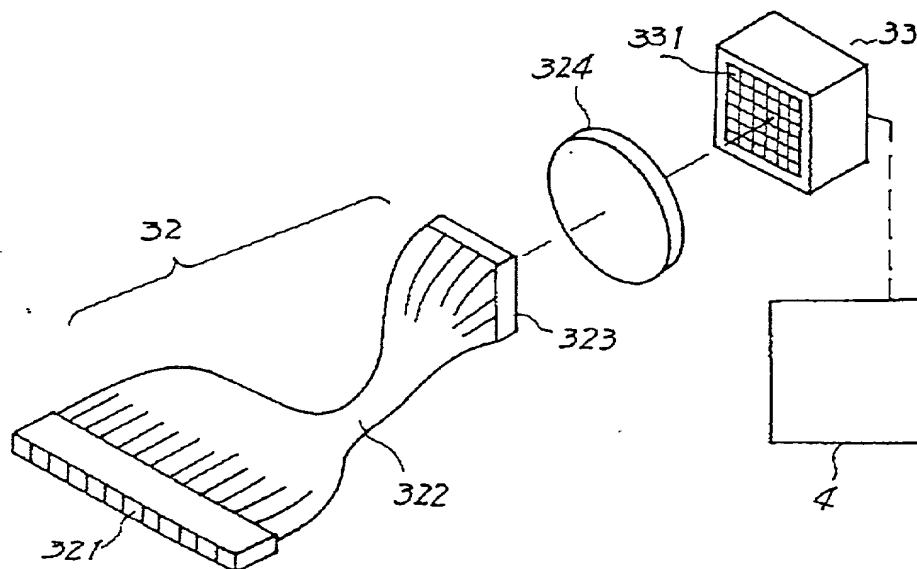
図 19



09678652.100400

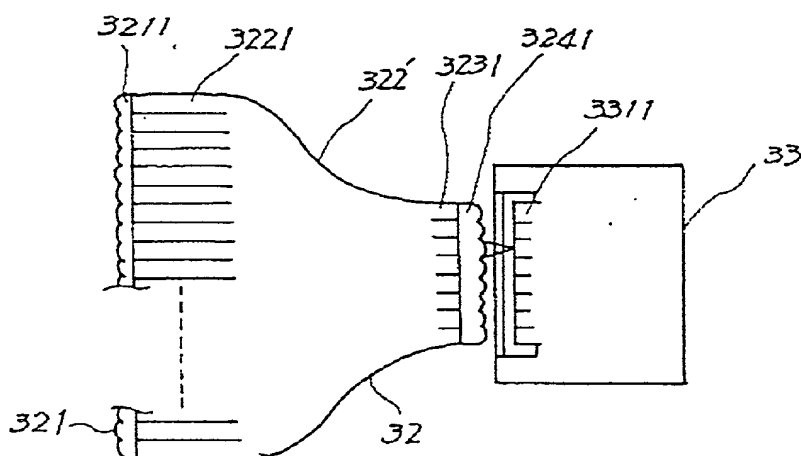
【図 20】

図 20



【図 21】

図 21

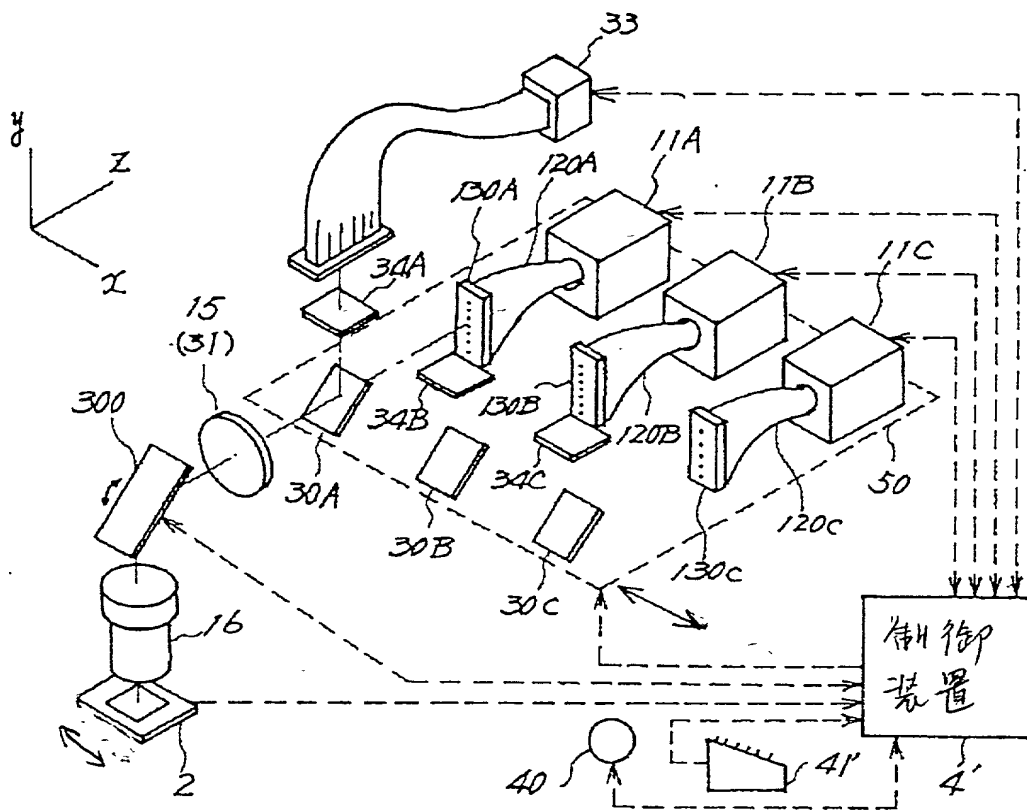


004001" 2598/260

(一)

【図 22】

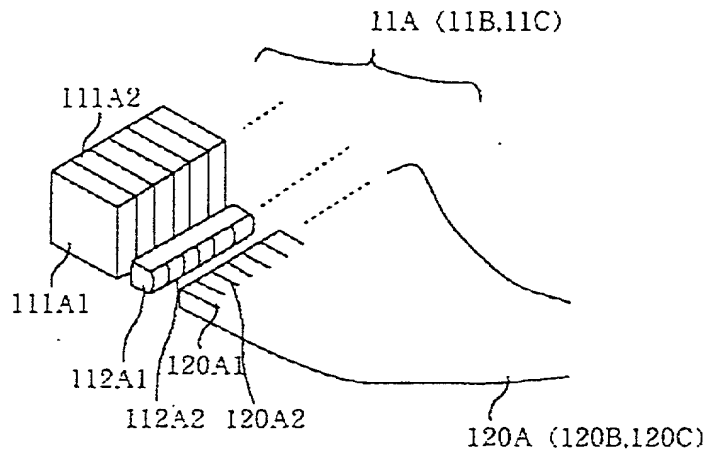
図 22



004001 2592960

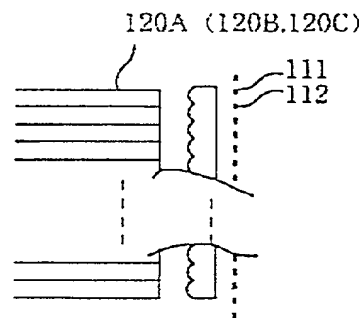
【図 23】

図 23



【図 24】

図 24

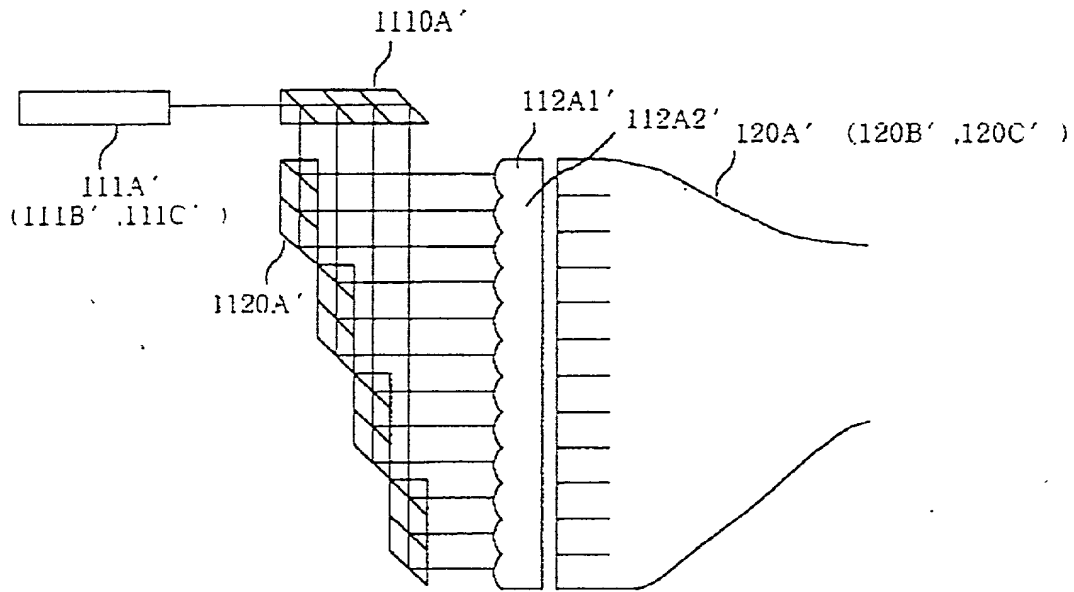


004001-2592/550

ファイル名 = D99007021A1.e1

【図 25】

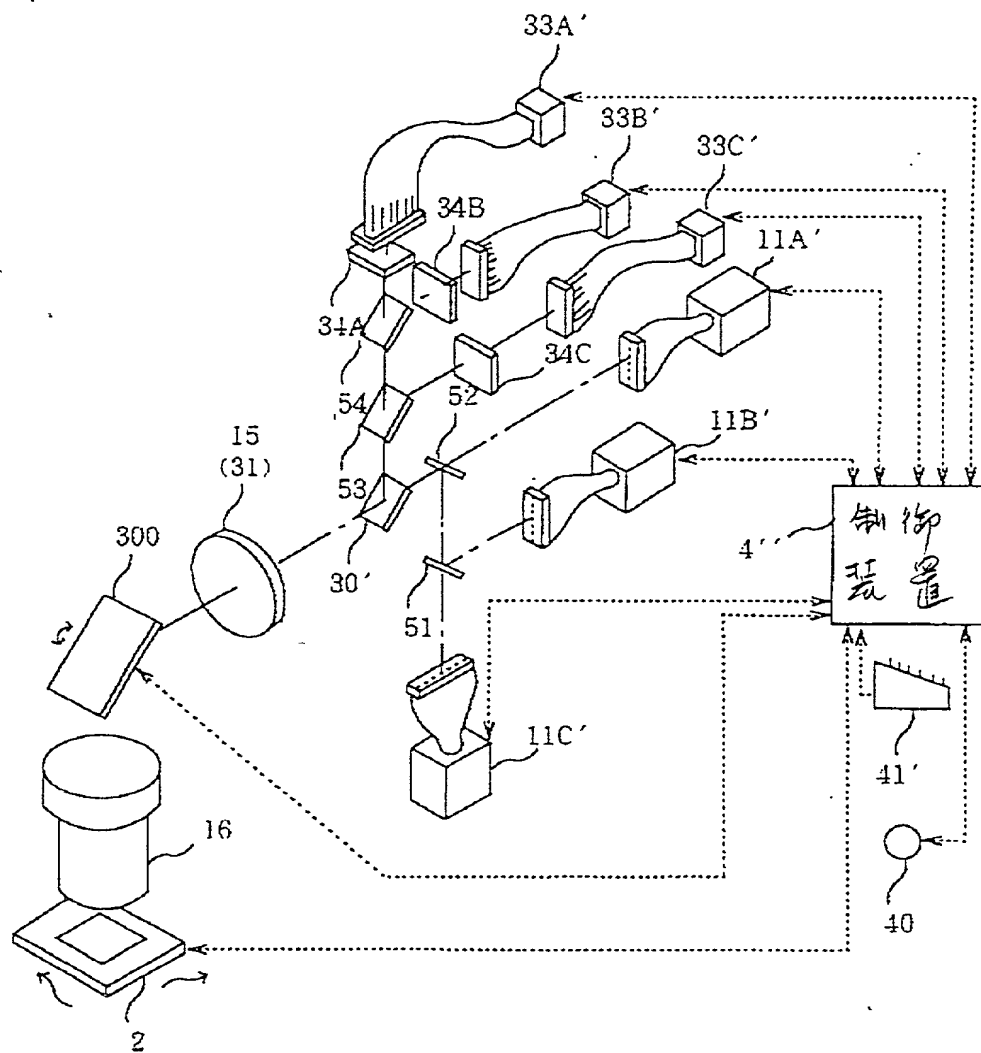
図 25



09678652 100400

【図 26】

図 26

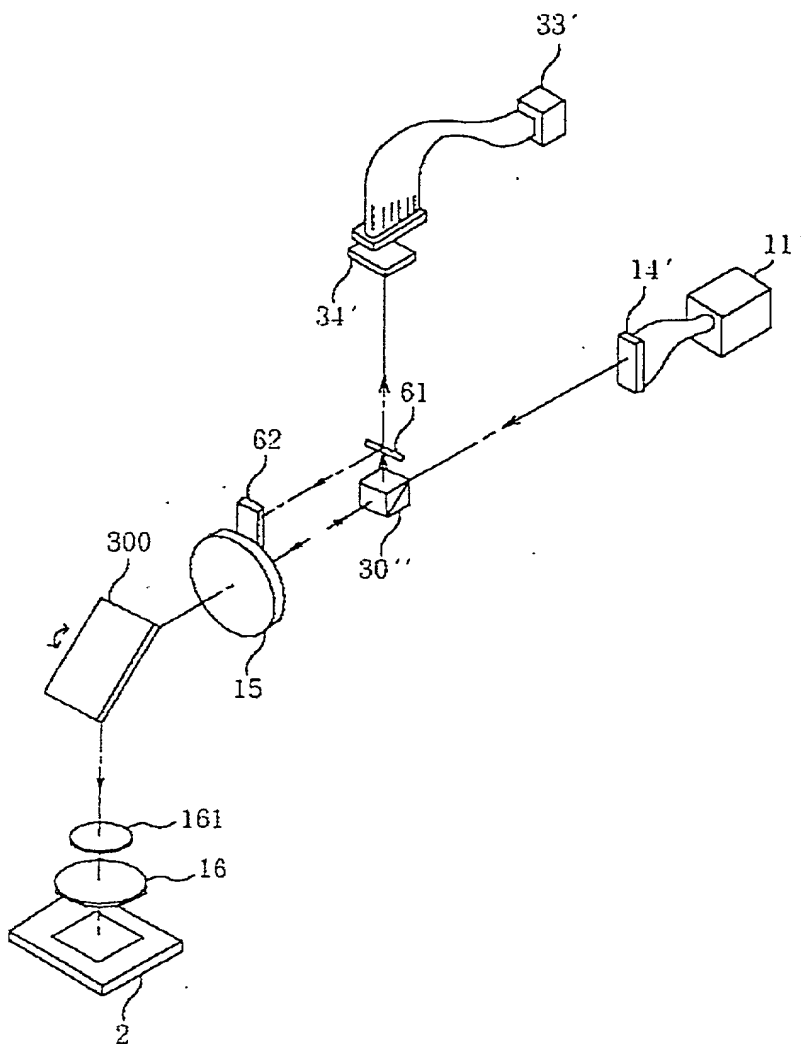


00400T" 259B/950

11

【図 27】

図 27

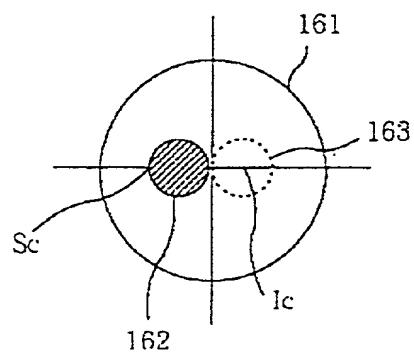


004001" 2593/259

ファイル名 = D99007021A1.e1

【図 28】

図 28

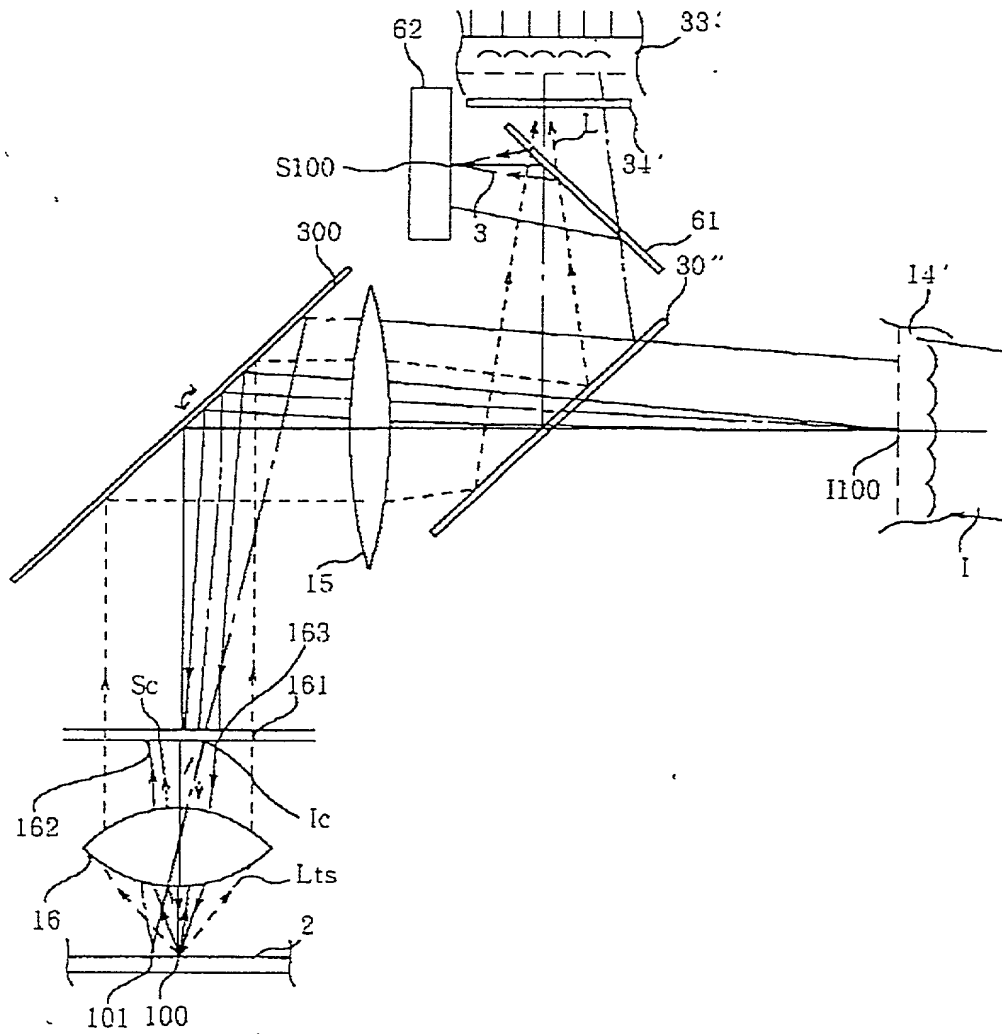


004001 2598/959

11

【図 29】

図 29



D99007021A1.e1

09676652.100400

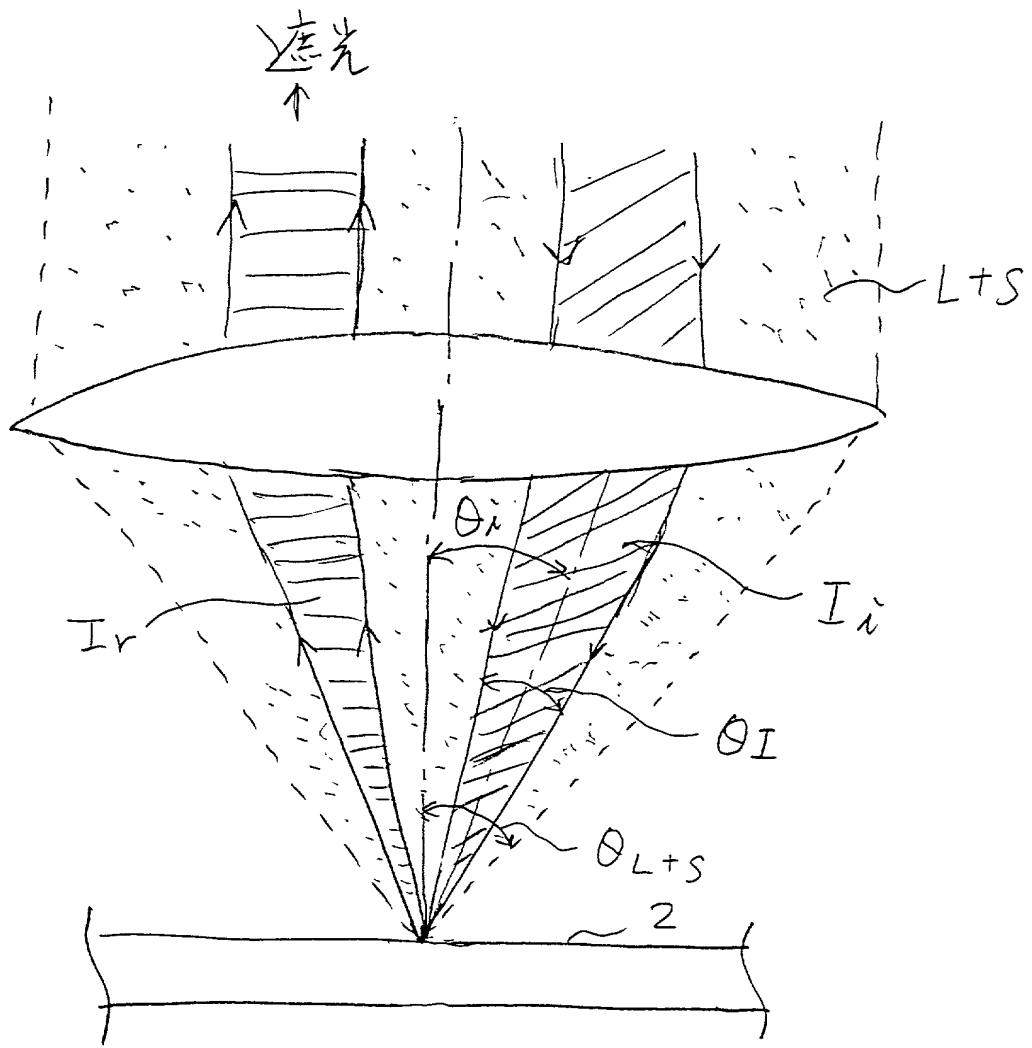


图 30

ファイル名 = D99007021A1.el

~~図 31~~

図 31 A

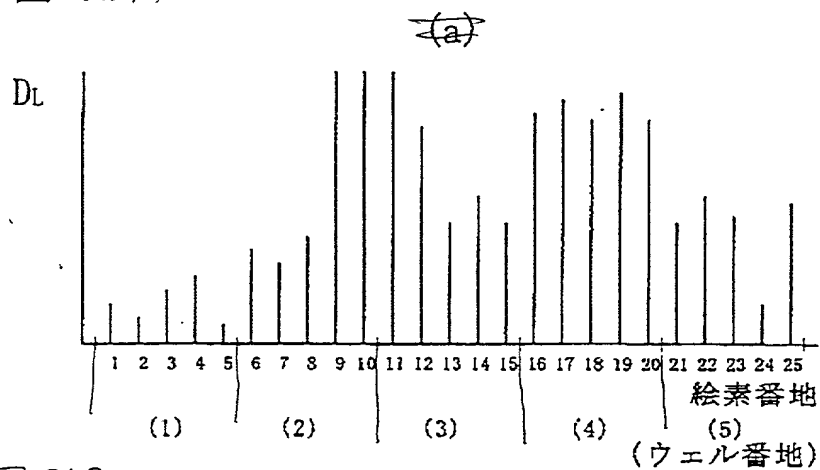


図 31 B

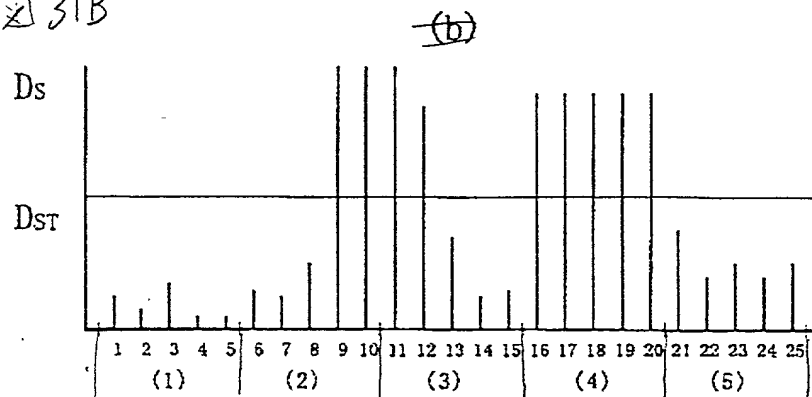
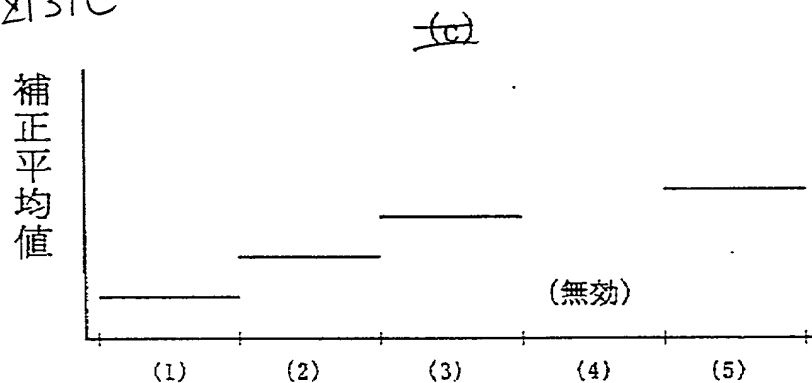


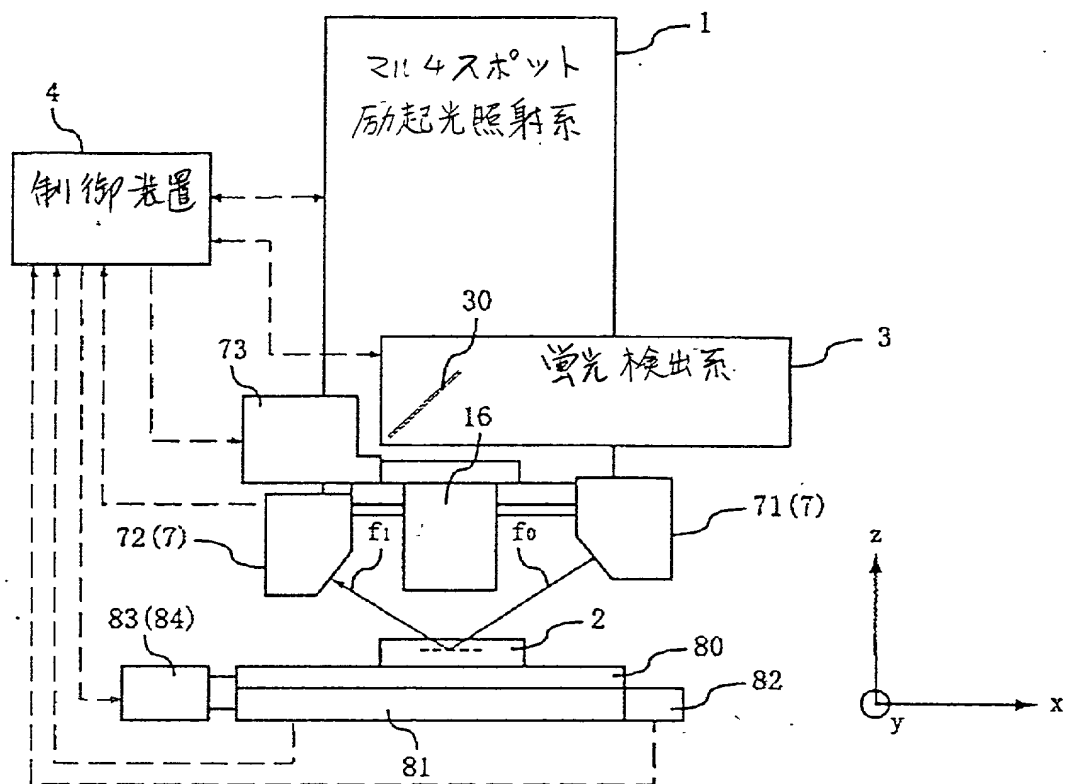
図 31 C



D99007021A1.el

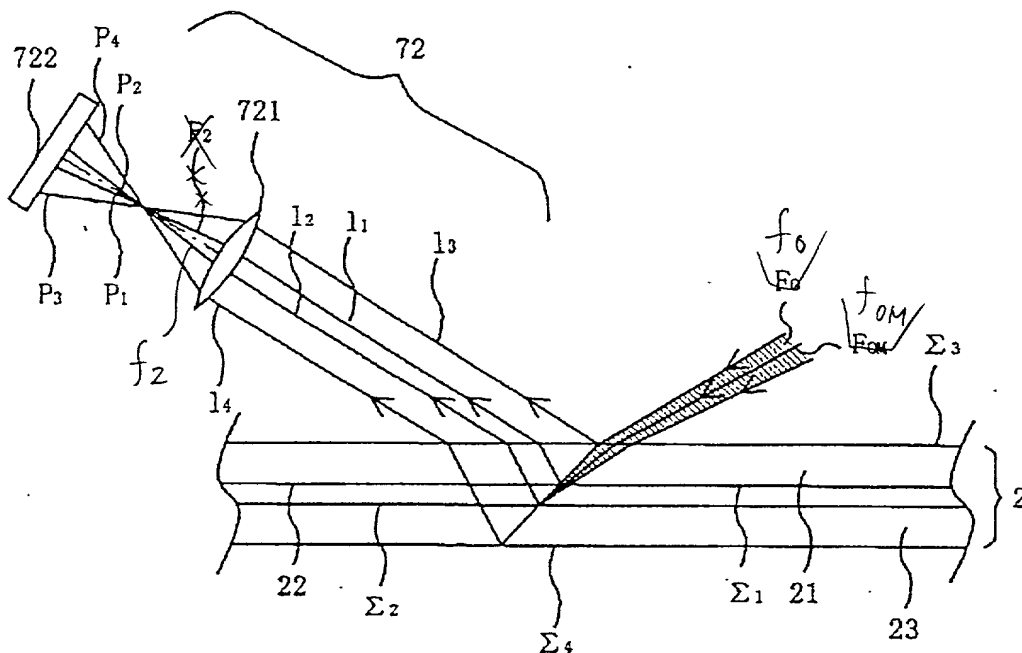
【図 32】

図 32



【図 33】

図 33

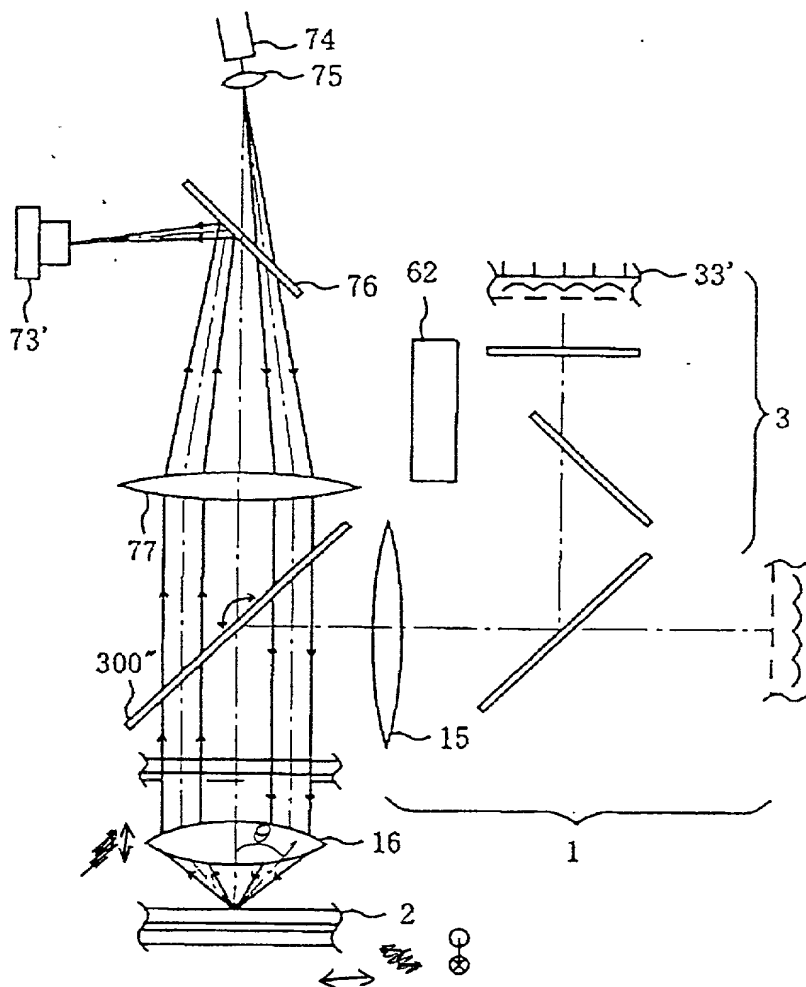


004001" 2553/959

1

【図 34】

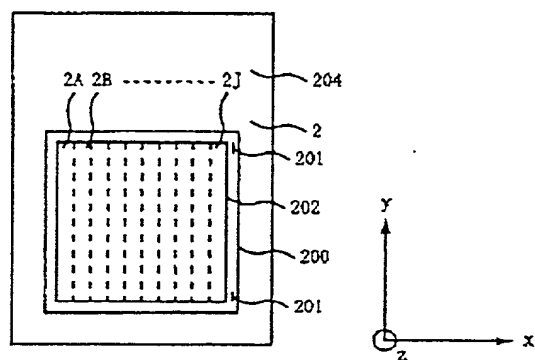
図 34



004001-2592-000

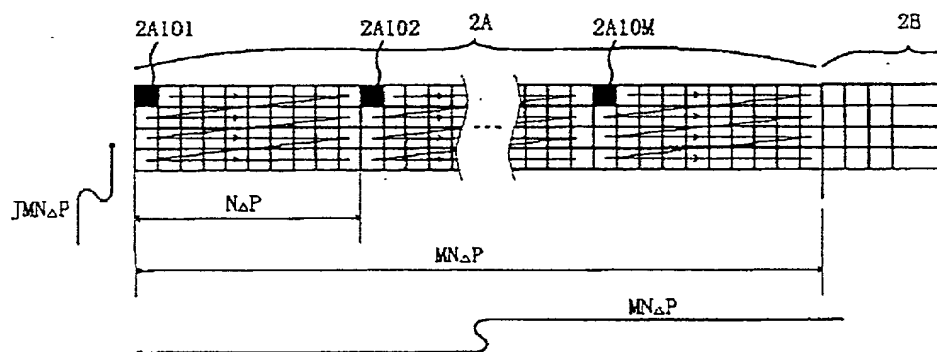
【図 35】

図 35



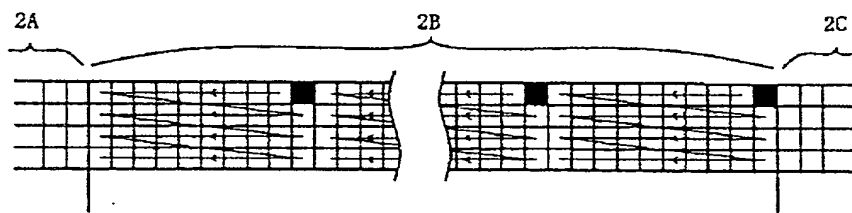
【図 36】

図 36



【図 37】

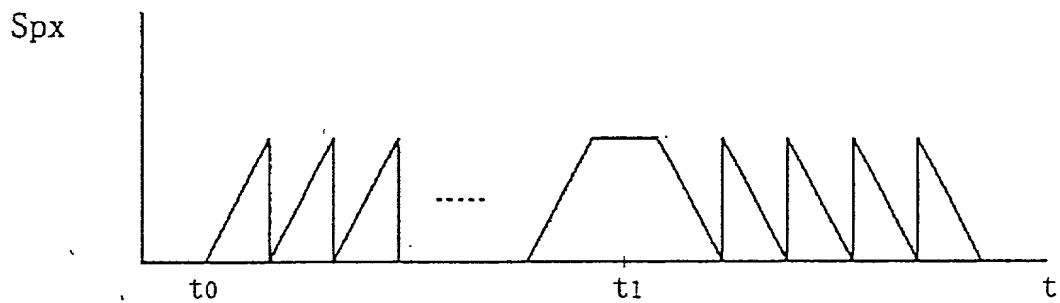
図 37



ファイル名 = D99007021A1.el

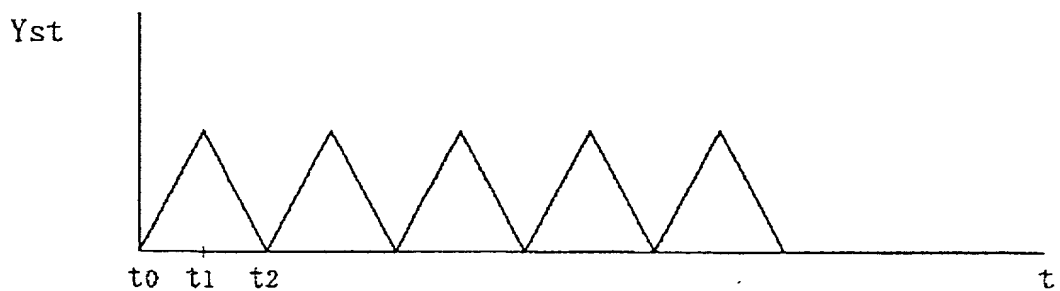
【図 38】

図 38



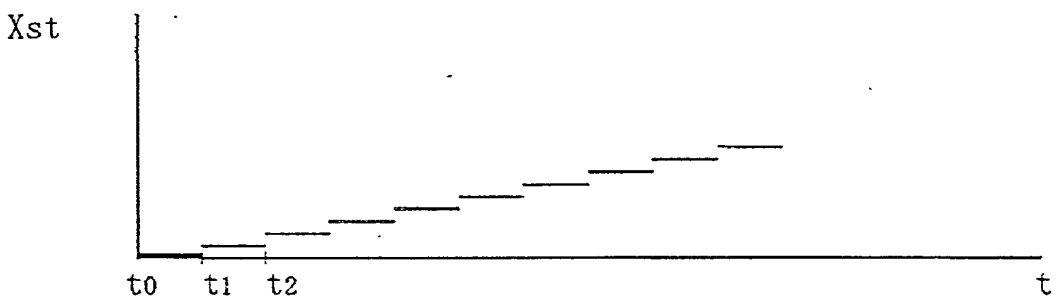
【図 39】

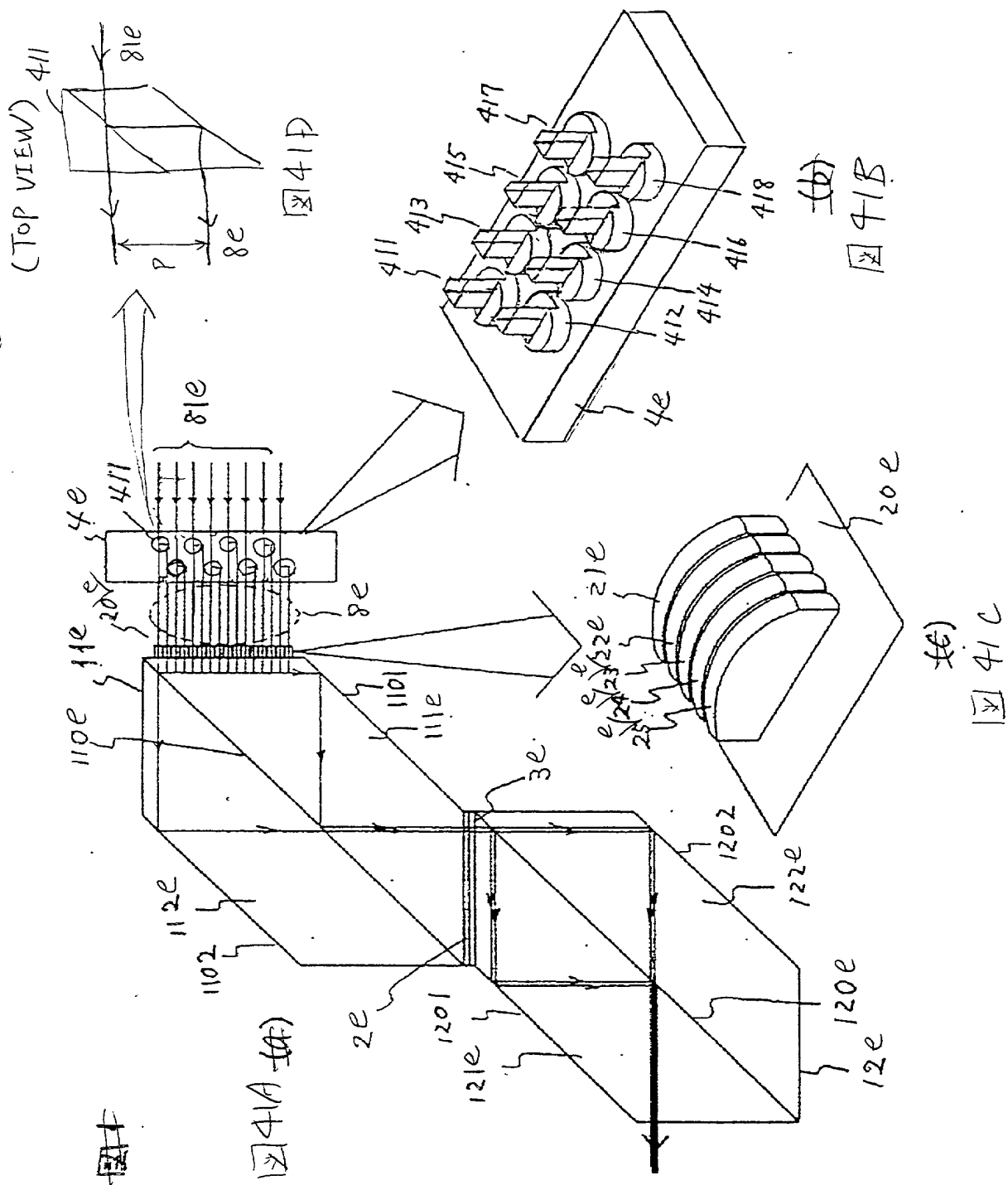
図 39



【図 40】

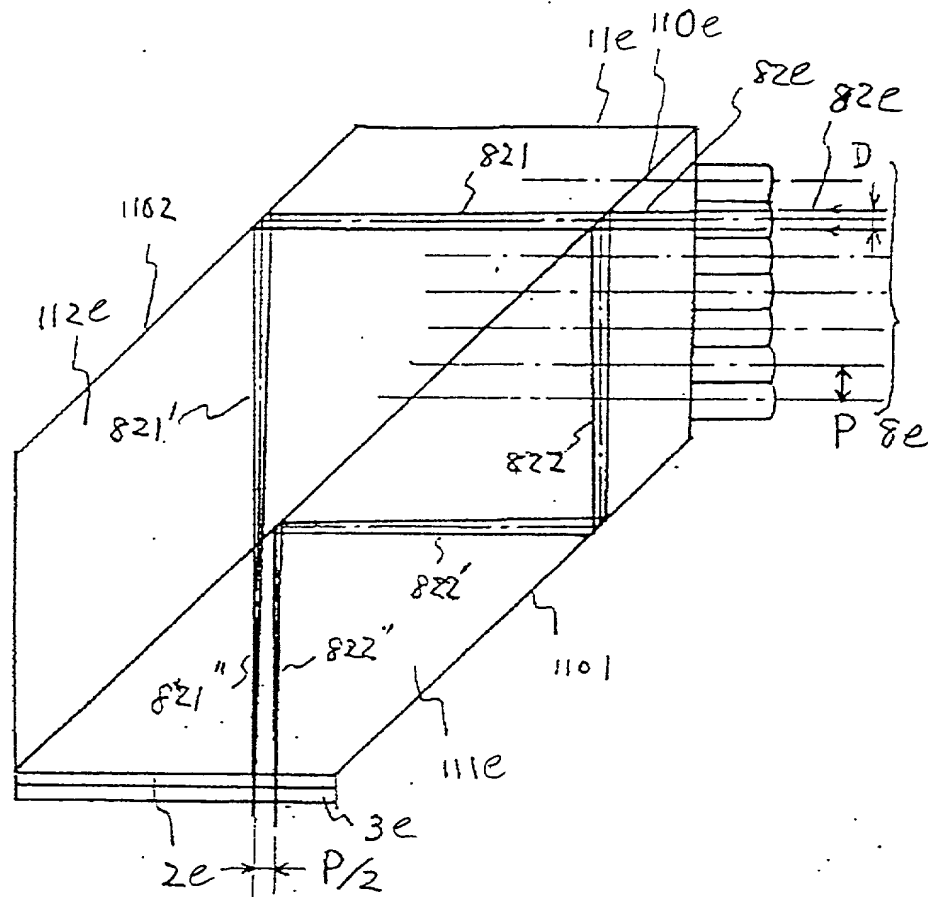
図 40





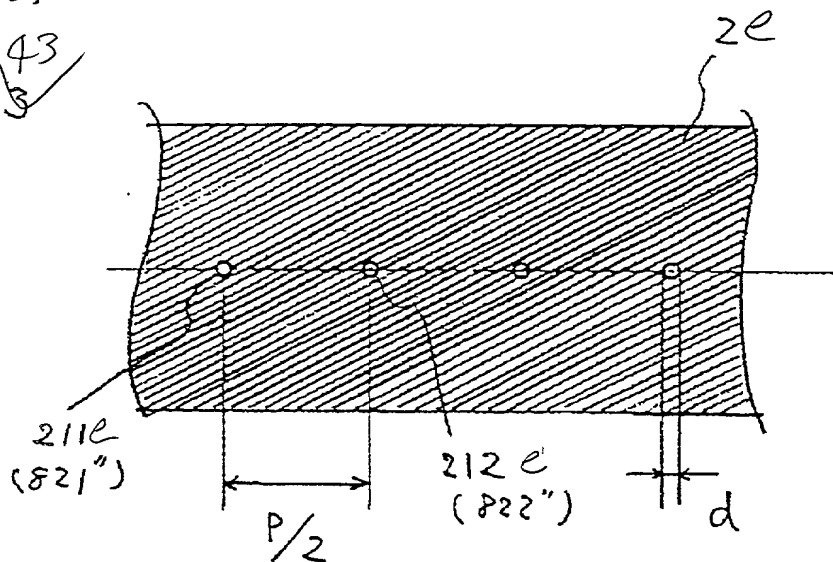
[図2]

図2
42



[図3]

43
図3

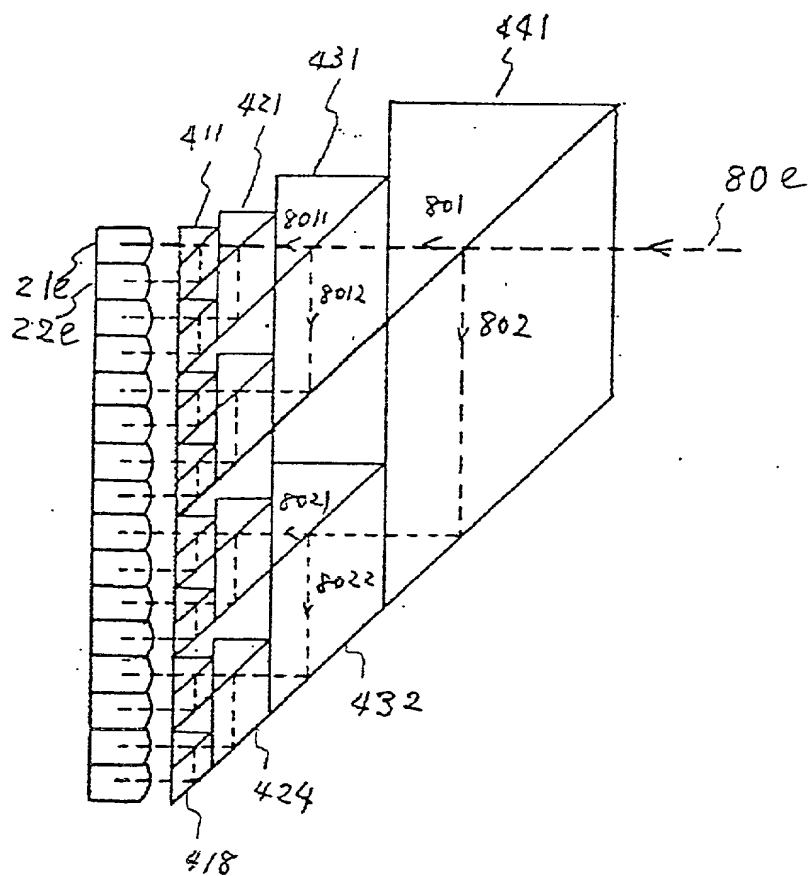


09678652.100400

ファイル名 = D00000201A1.e1

[図 4]

図 4
44

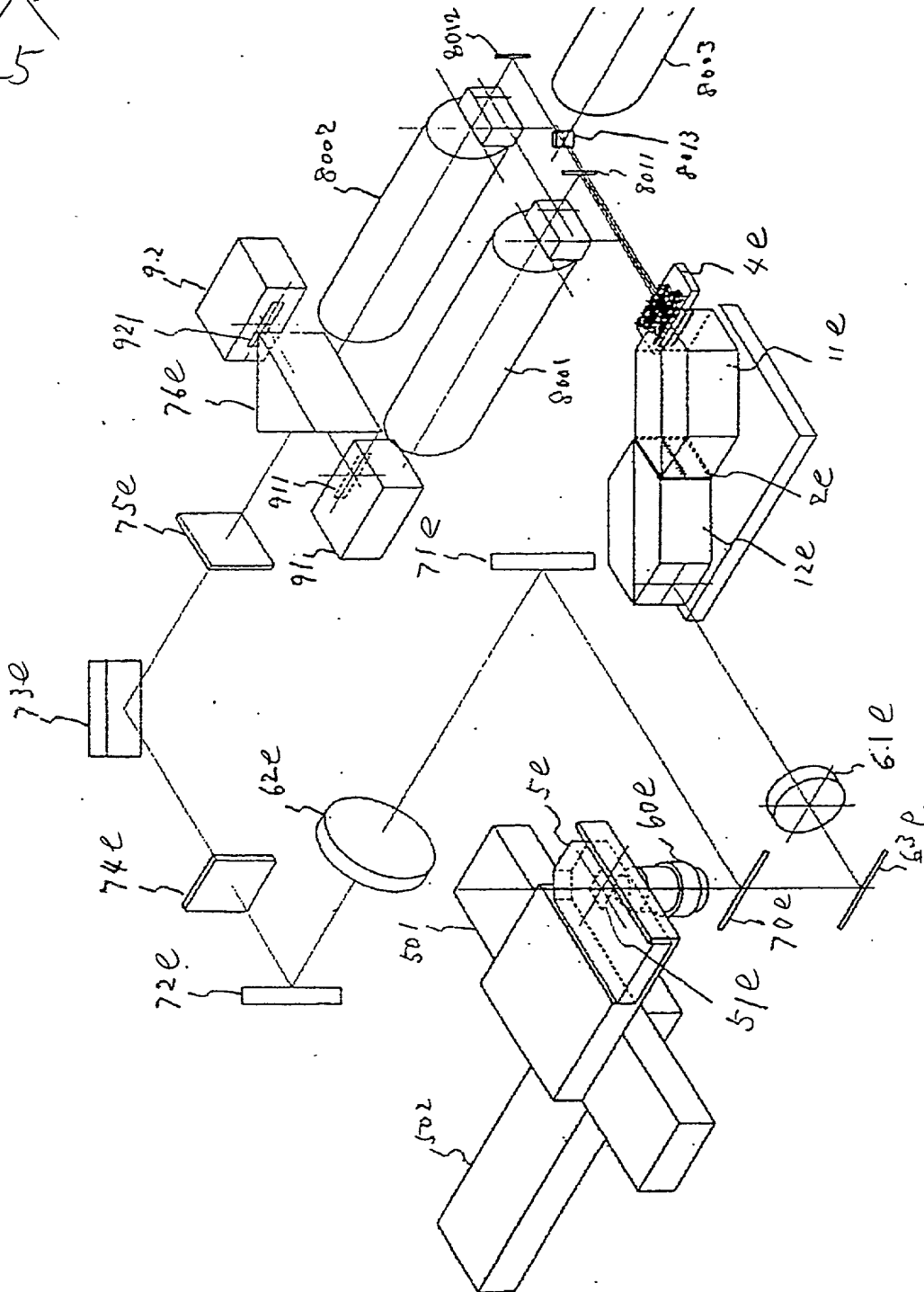


096786592.100400

ファイル名 = D00000201A1.e1

【図 5】

45



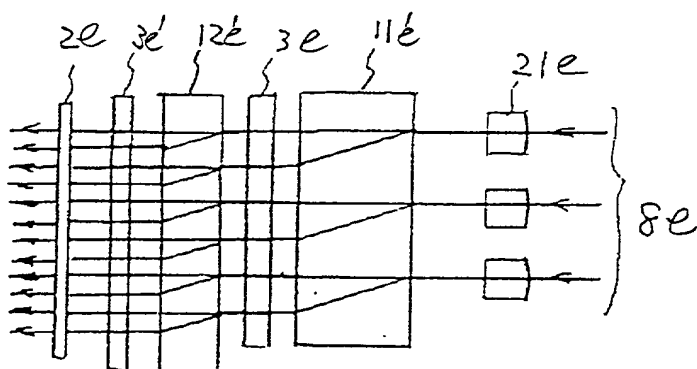
004001" 2598/950

275

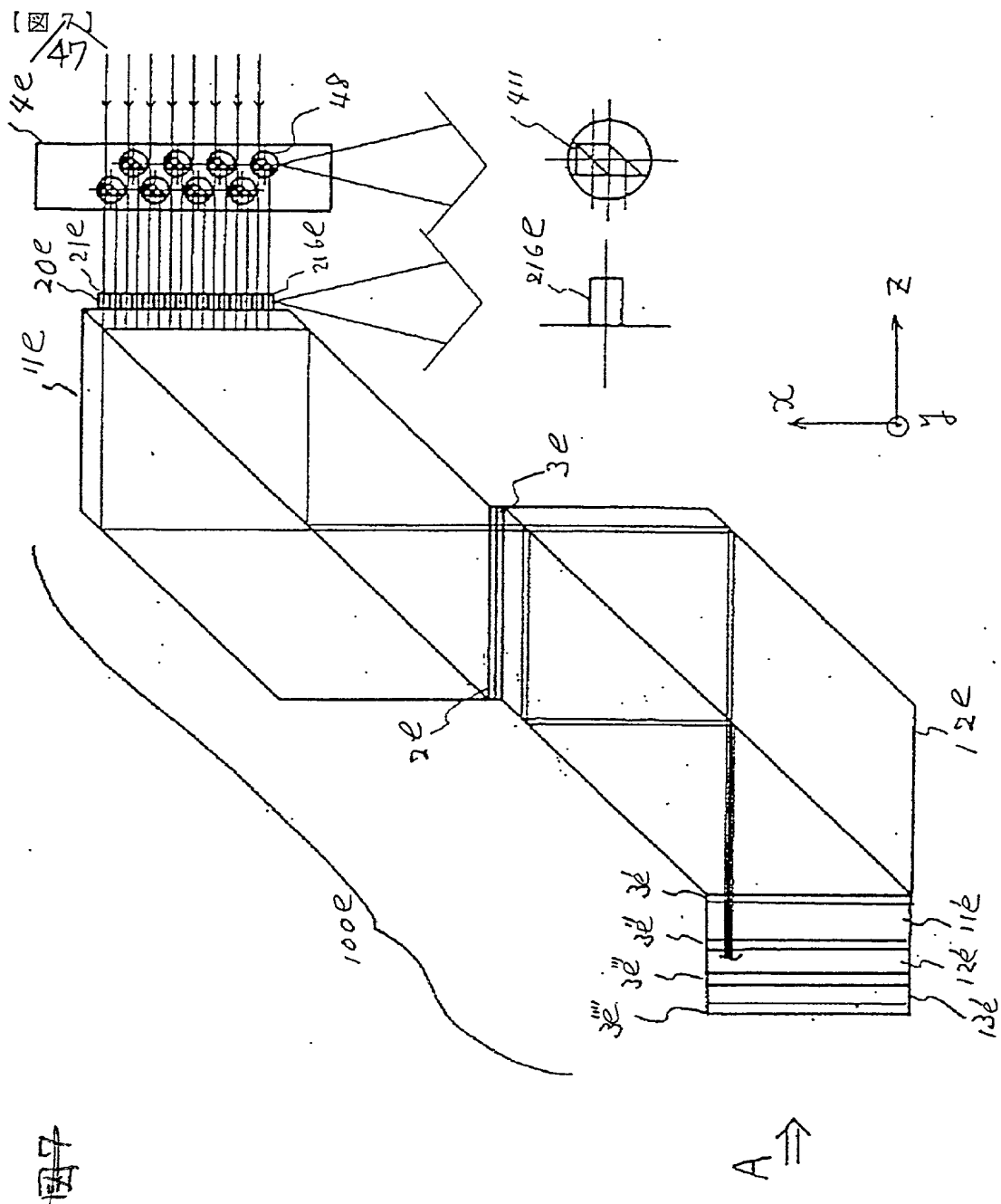
ファイル名 = D00000201A1.e1

【図8】

図8
46



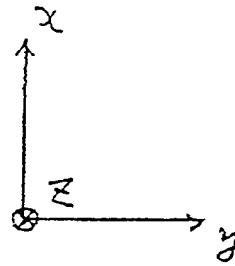
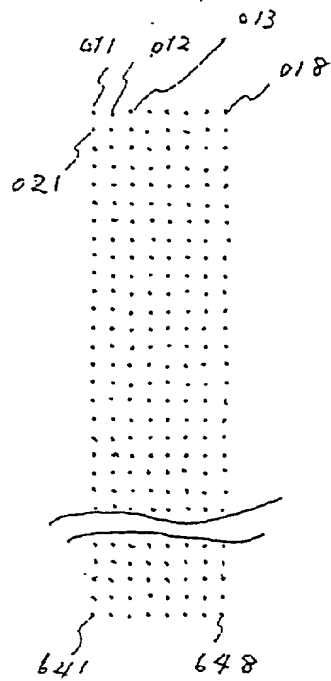
05070652.100400



ファイル名 = D00000201A1.el

【図 8】

図 8
48

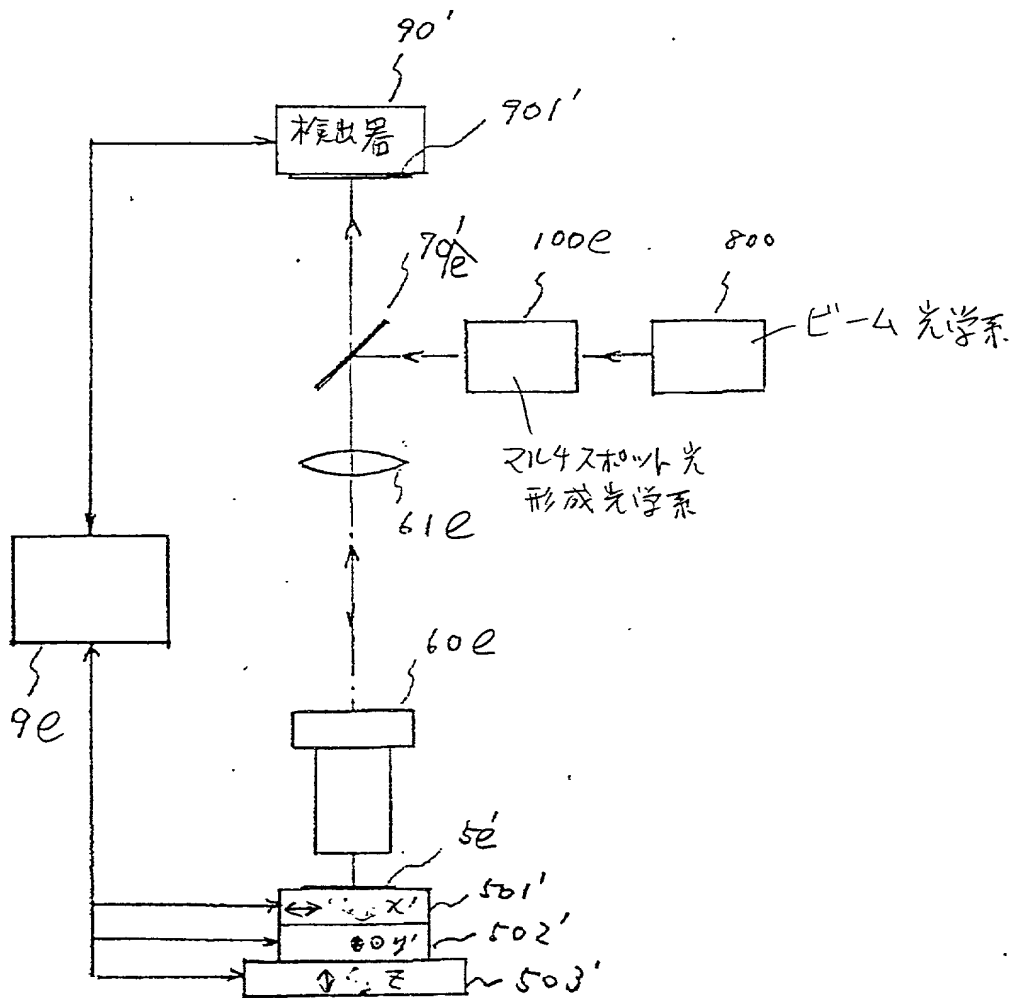


09678652.100400

ファイル名 = D00000201A1.e1

図 8

図 9
49

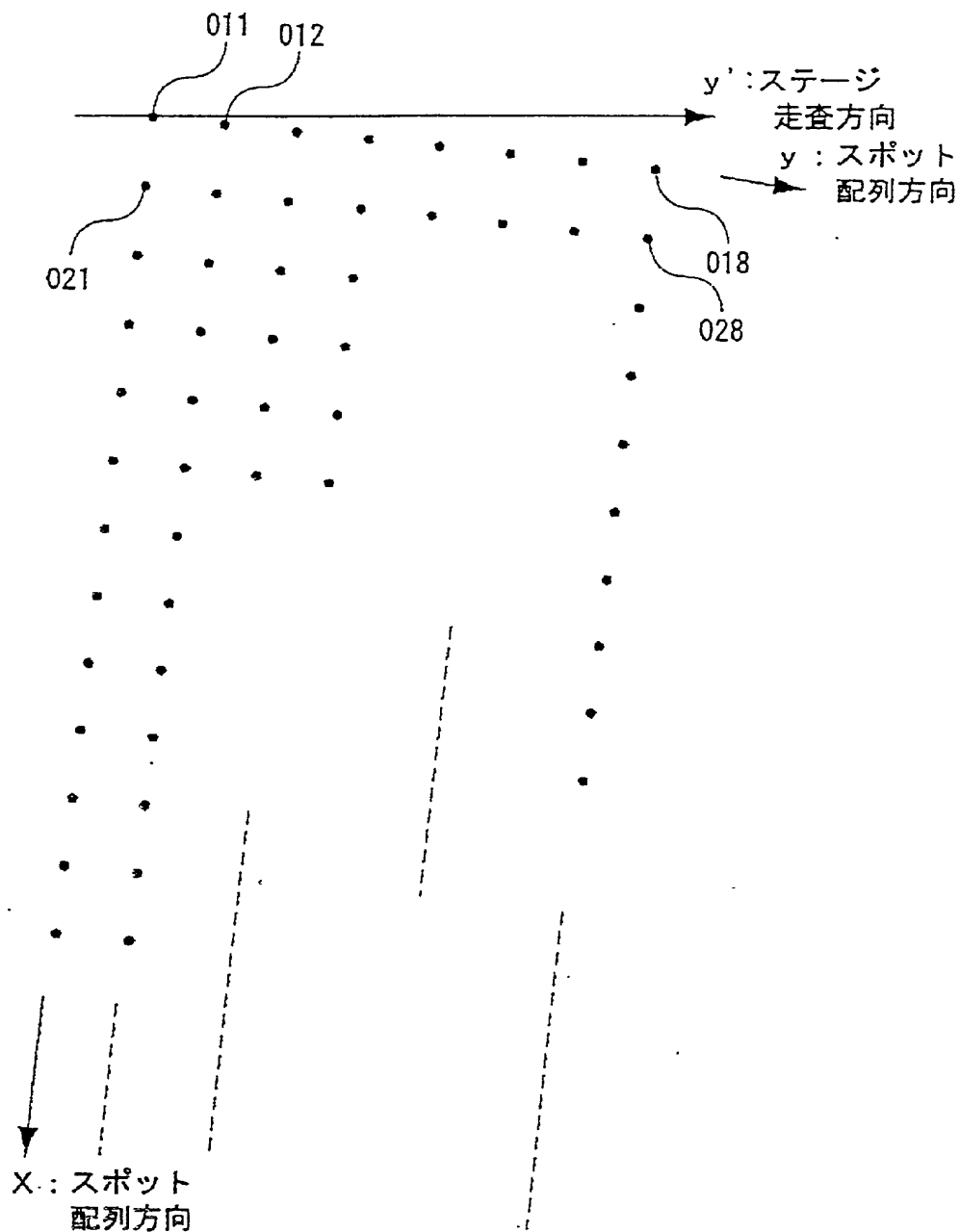


09678652.100400

ファイル名 = D00000201A1.el

【図 10】

図 10

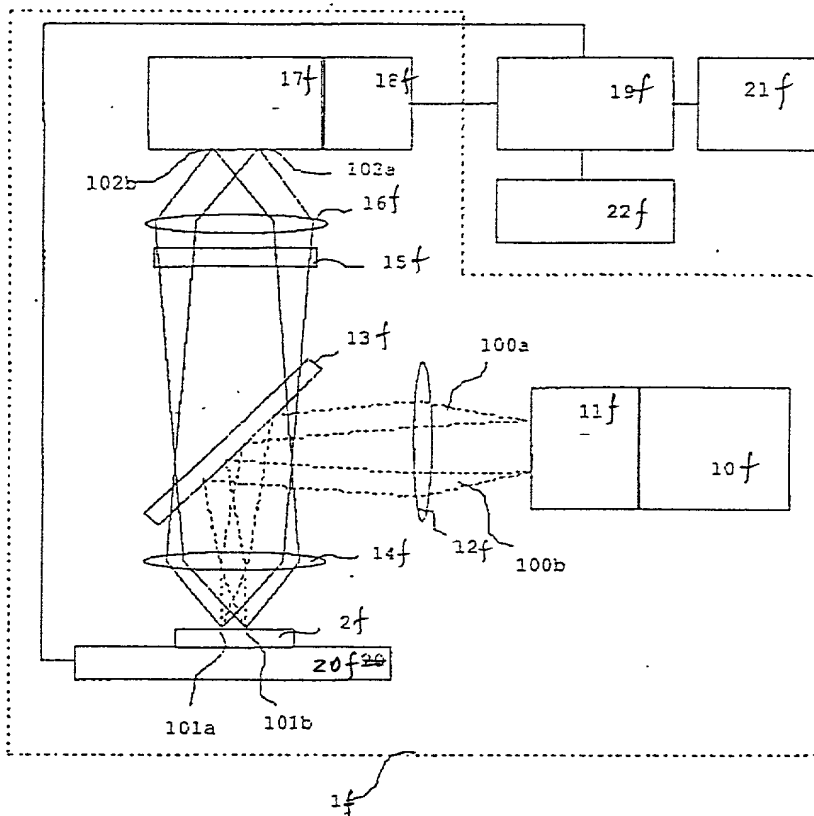


09678652.100400

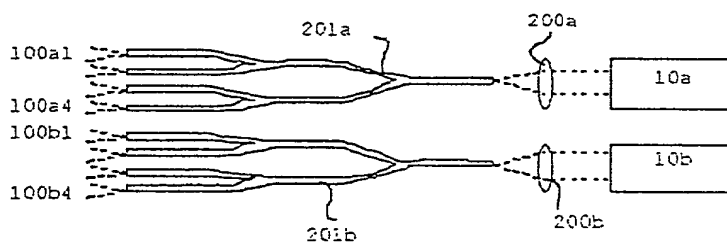
ファイル名 = A00011581A1.e1

【書類名】 図面

【図 51】



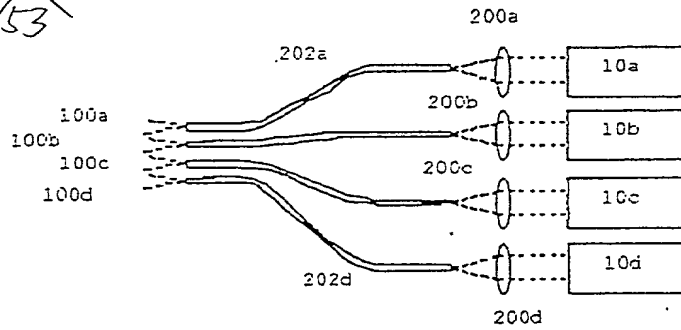
【図 52】



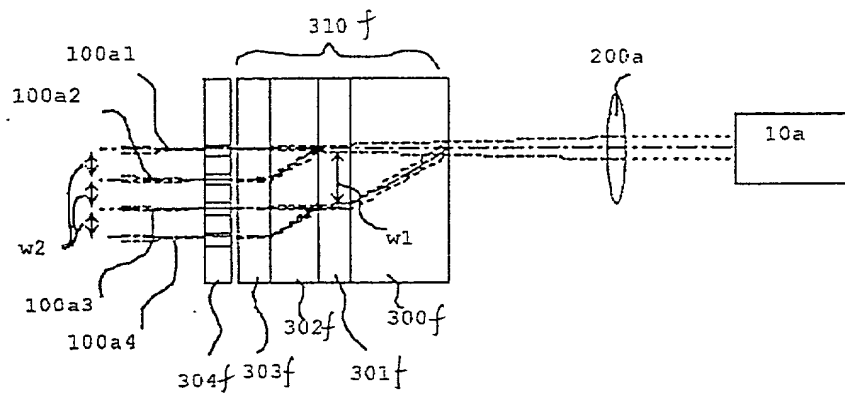
09073652.100400

ファイル名 = A00011581A1.el

【圖 3】



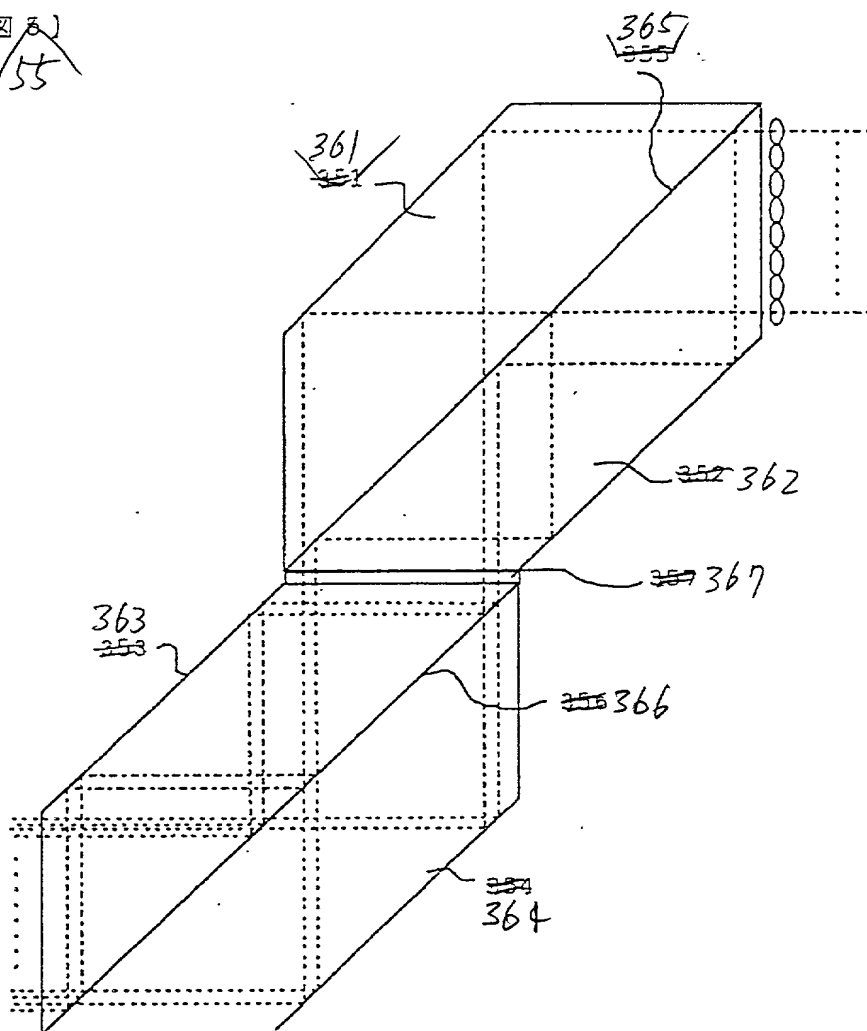
【図4】



ファイル名 = A00011581A1.e1

(図 8)

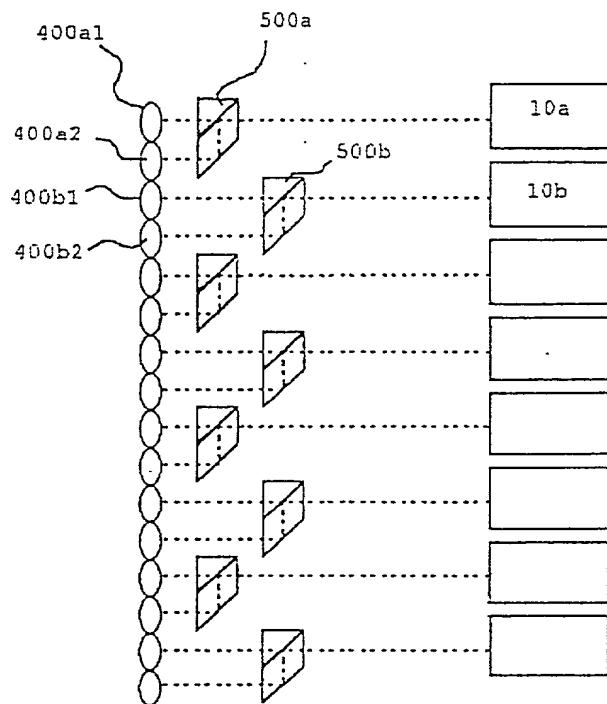
55



09678652.100400

ファイル名 = A00011581A1.e1

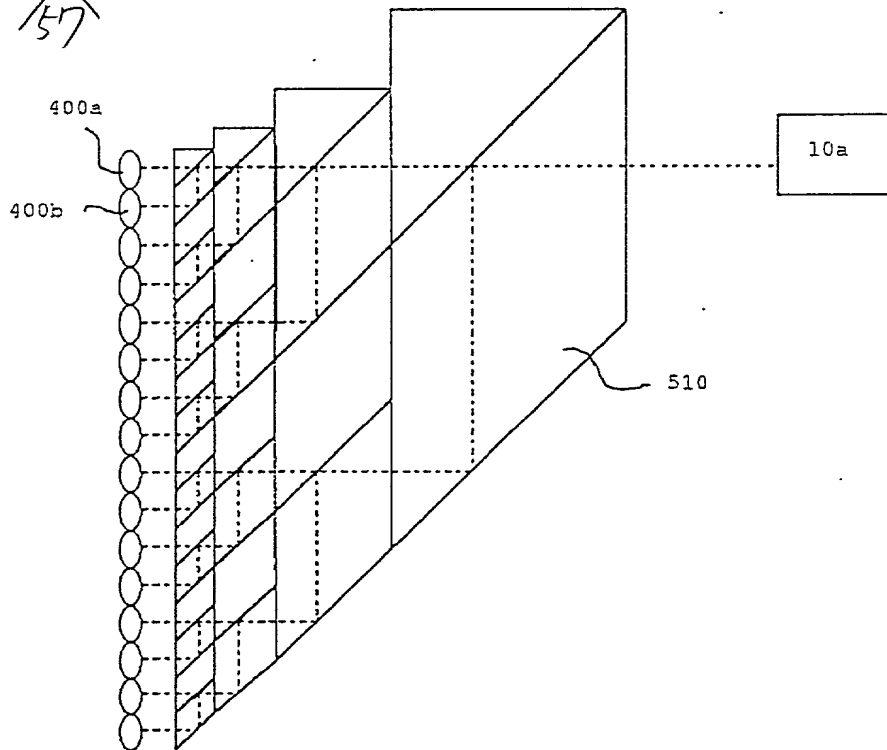
(図 56)



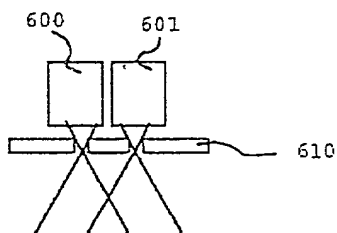
004001" 2593/950

ファイル名 = A00011581A1.e1

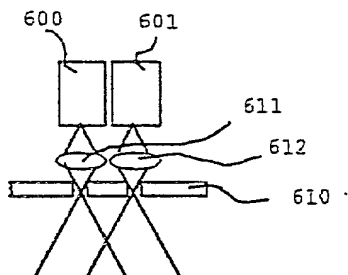
【図 7】
57



【図 8】
58



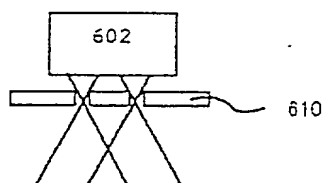
【図 9】
59



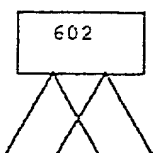
0907080901004000

ファイル名 = A00011581A1.e1

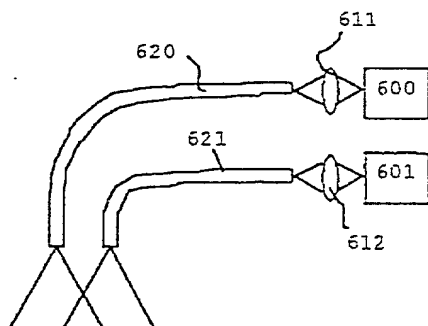
【図 1-0】



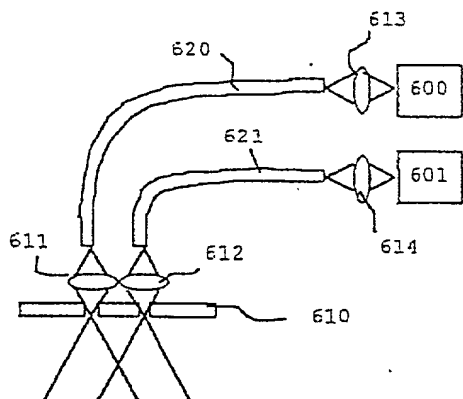
【図 1-1】



【図 1-2】



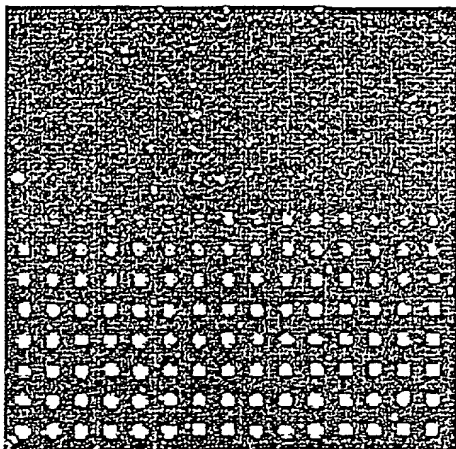
【図 1-3】



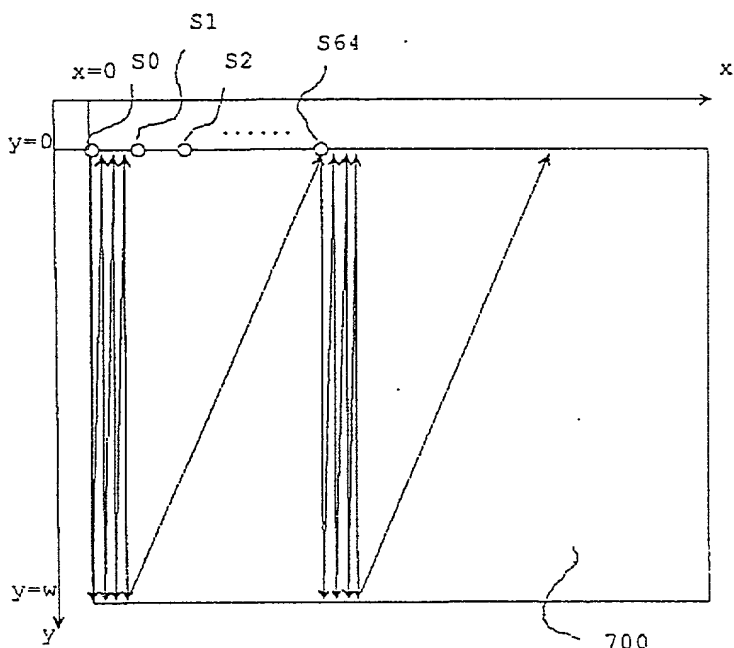
09678652.1004100

ファイル名 = A00011581A1.e1

【図 1-4】



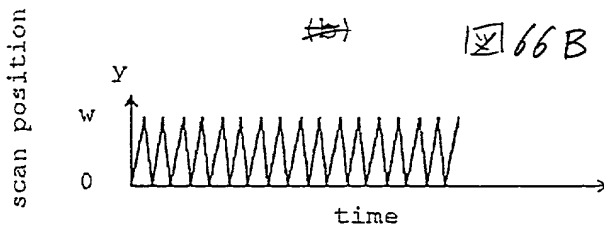
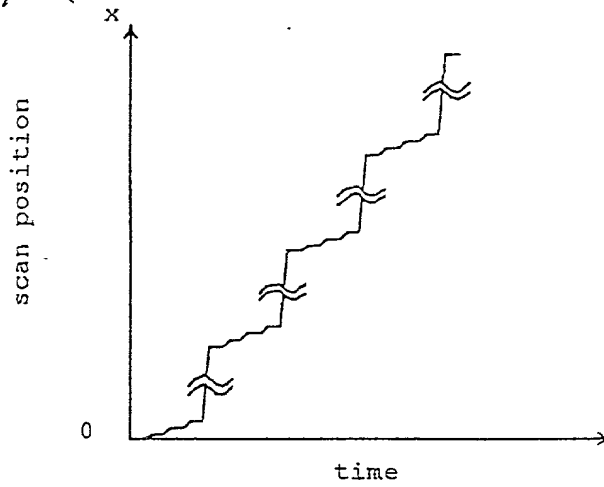
【図 1-5】



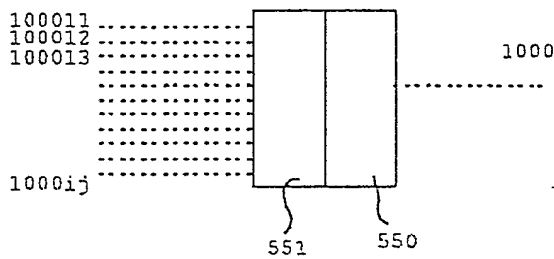
09678652 100400

ファイル名 = A00011581A1.e1

[図 16]
66A

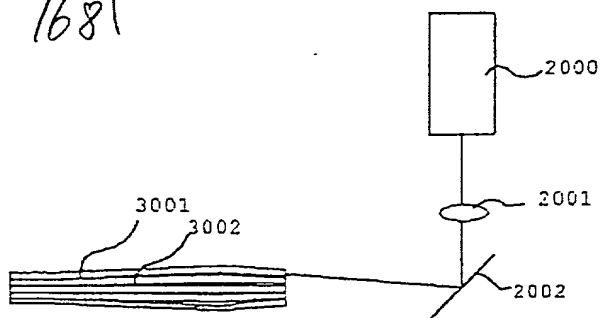


[図 17]
67

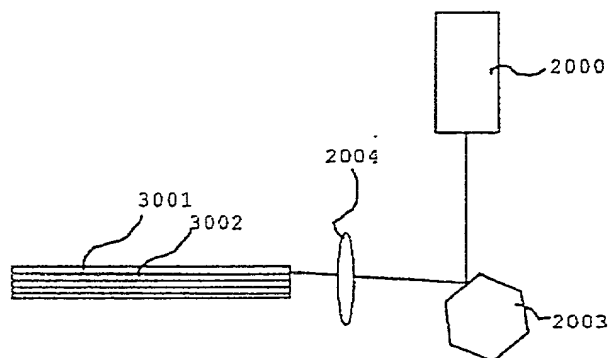


ファイル名 = A00011581A1.e1

【図 18】



【図 19】



09678652.100400

格中の113

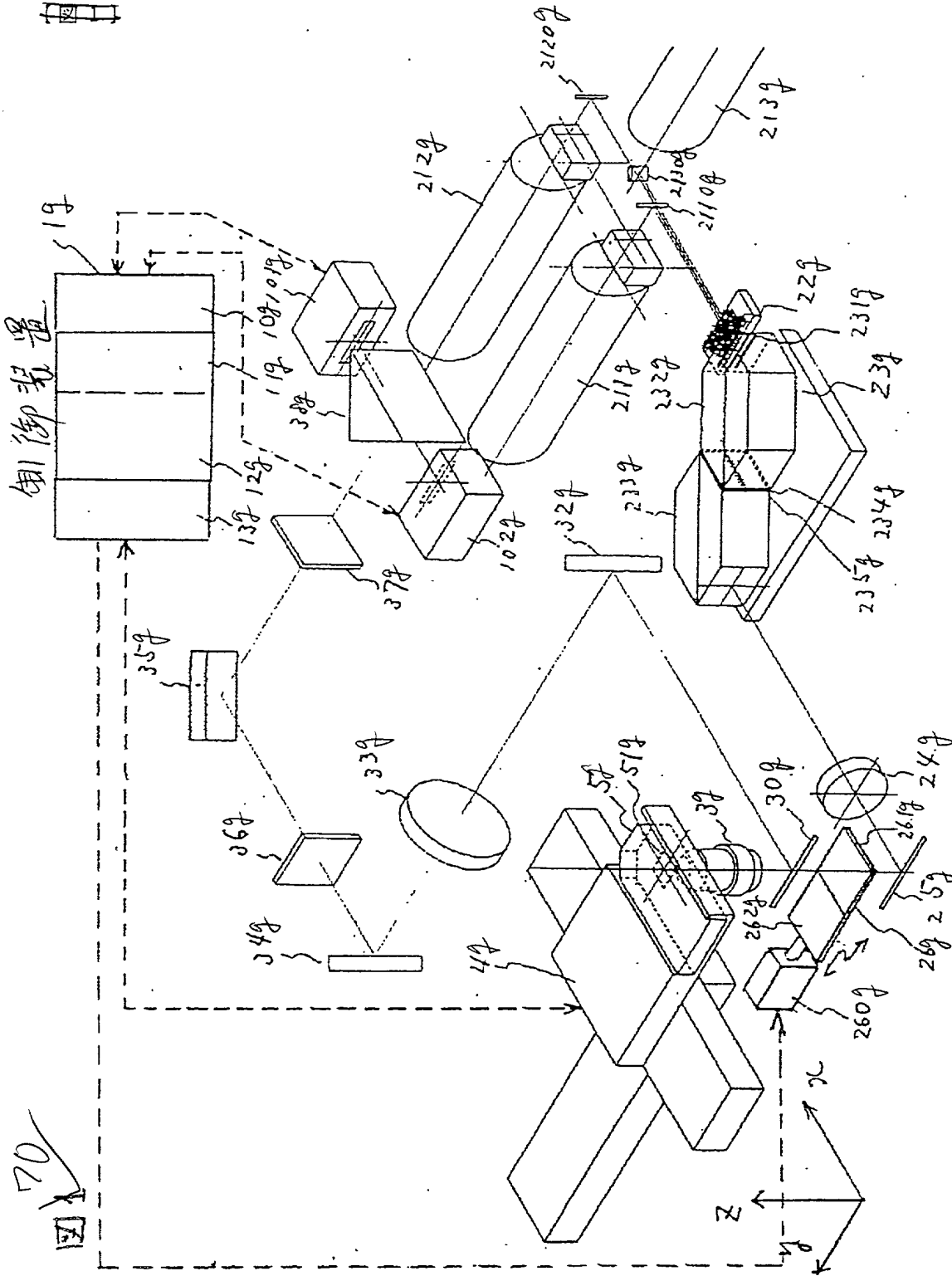
出願書類

2004001-2598/990

ファイル名 = D00005301A1.e1

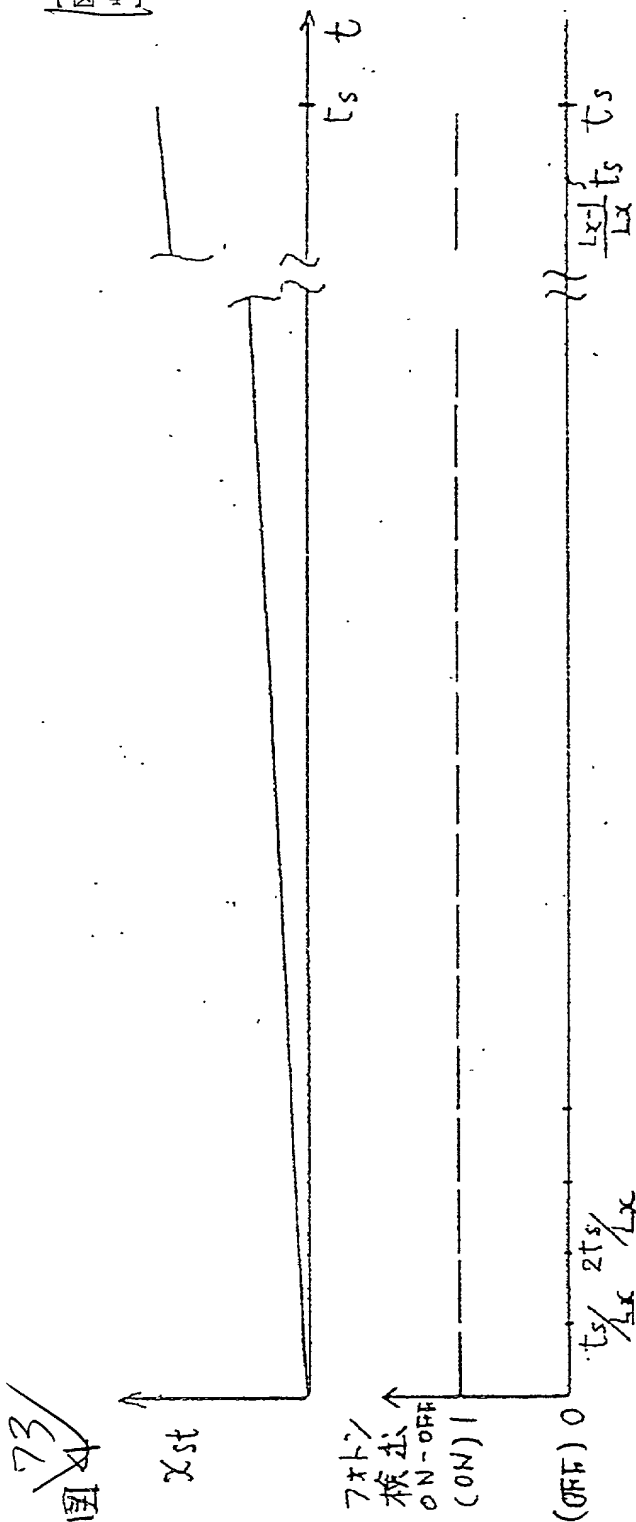
【書類名】 図面

図1



ファイル名 = D00005301A1.e1

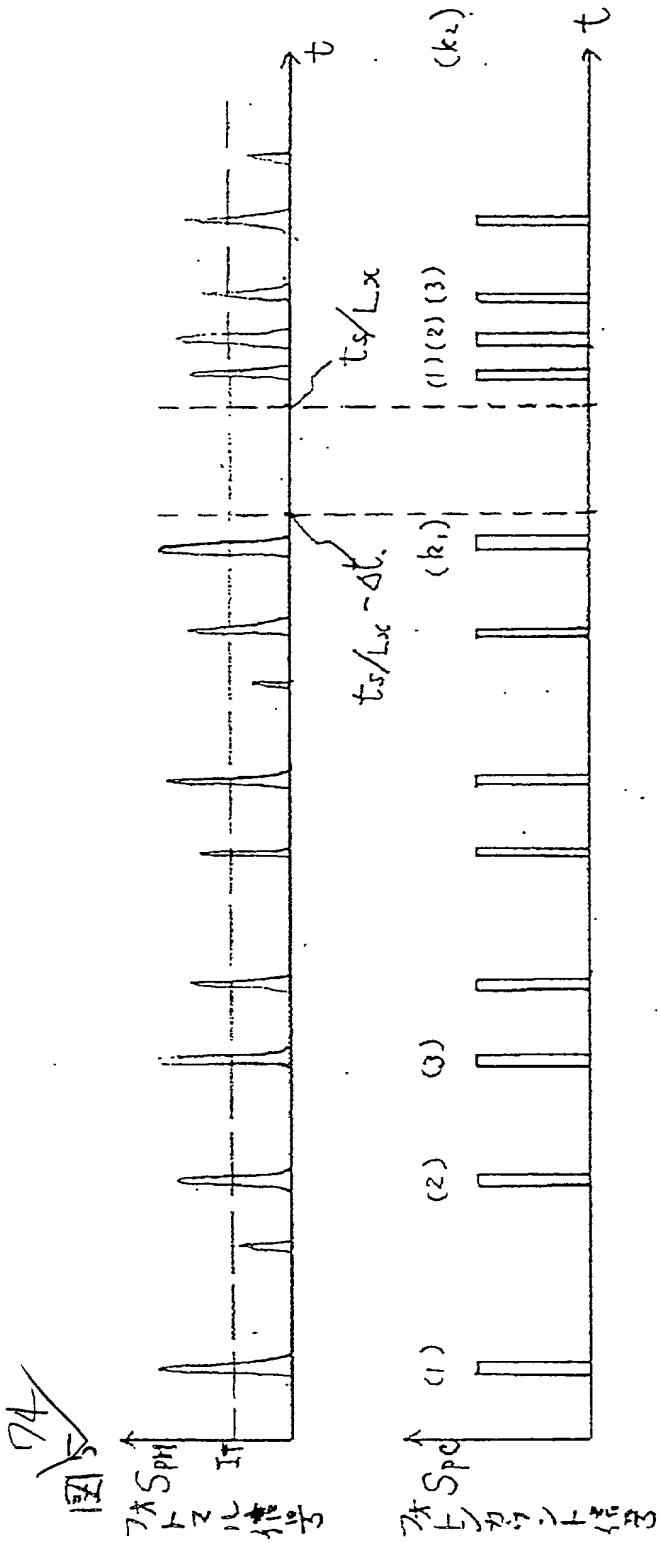
図 4



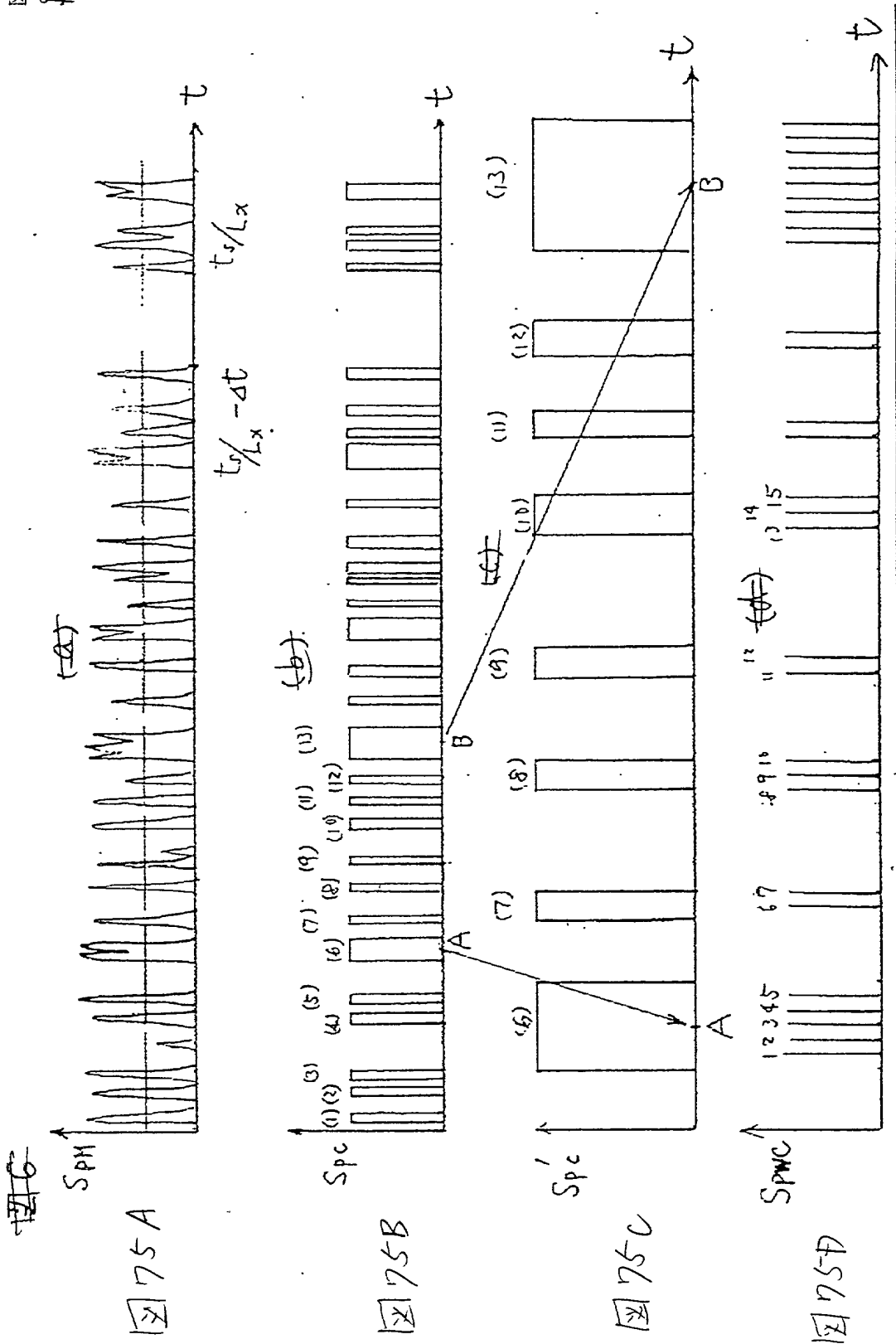
004001"2598/350

ファイル名 = D00005301A1.e1

[図 5]

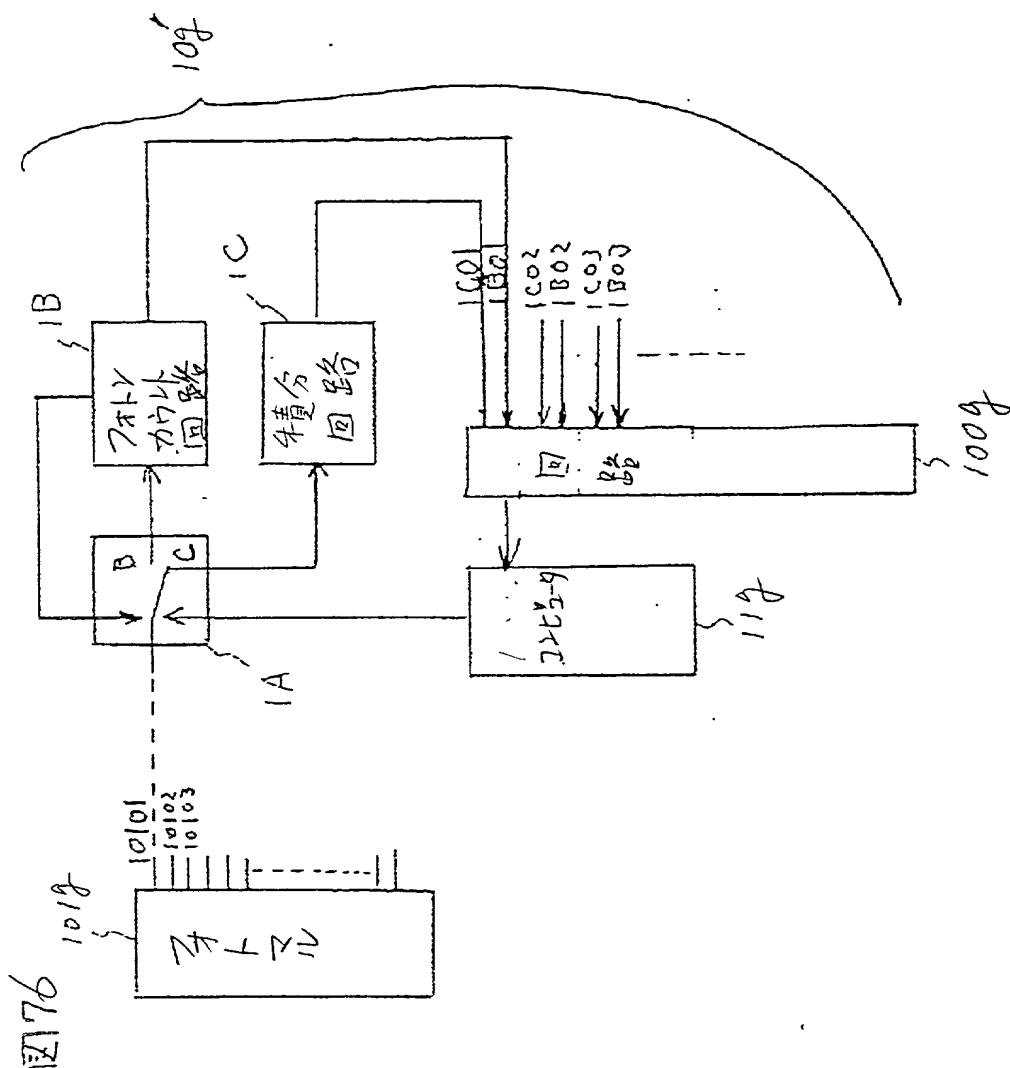


[図6]



ファイル名 = D00005301A1.el

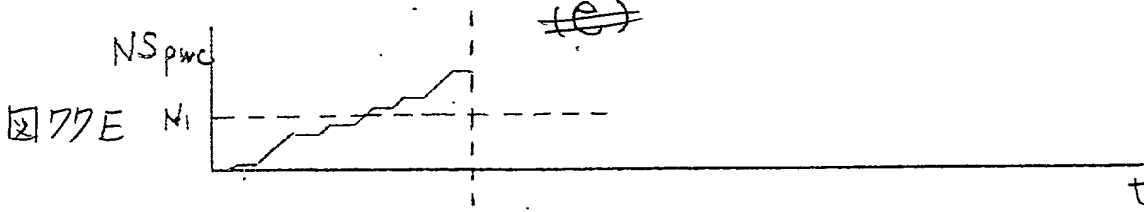
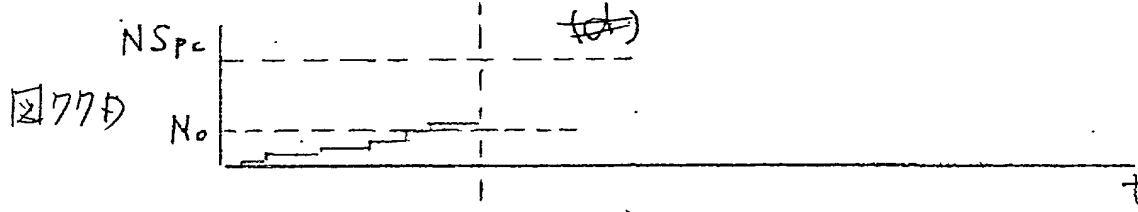
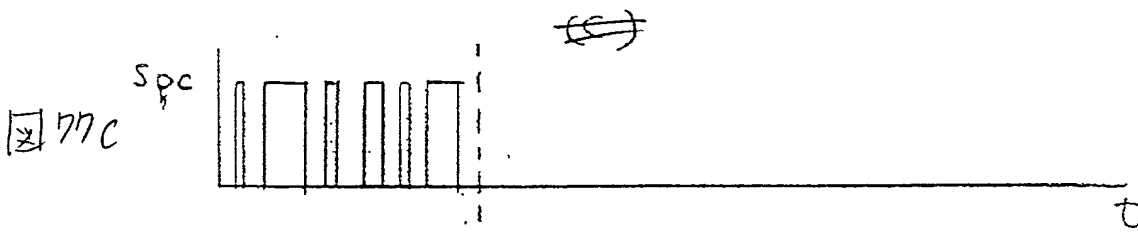
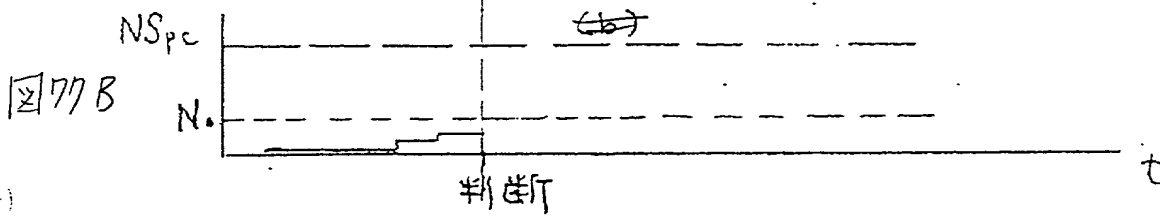
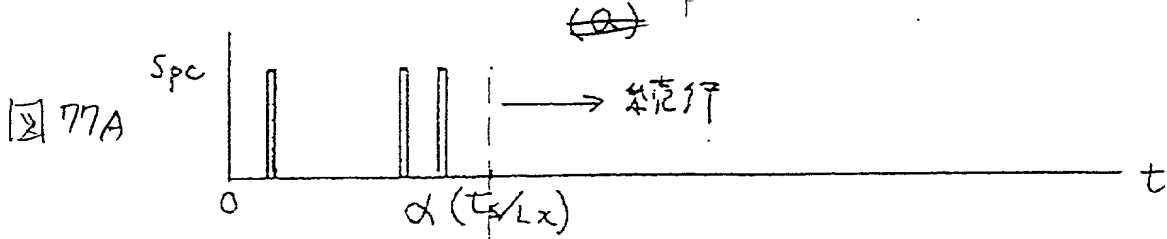
~~【兴】~~



ファイル名 = D00005301A1.e1

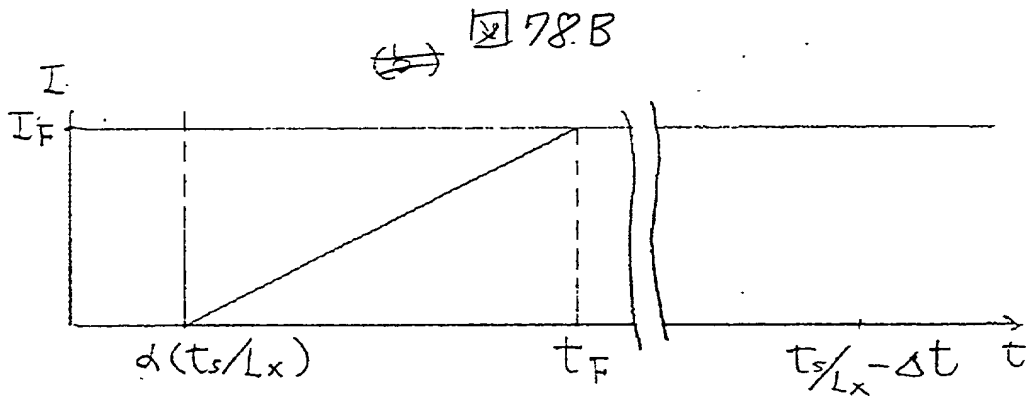
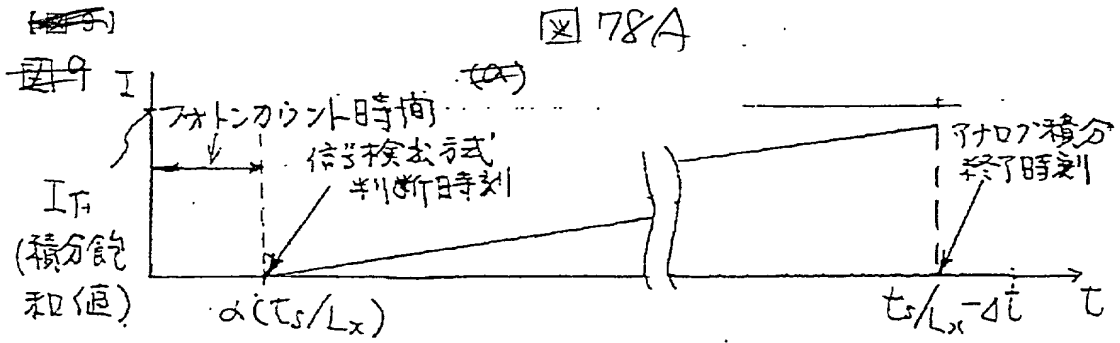
~~図8~~

~~図8~~



000005301A1.e1

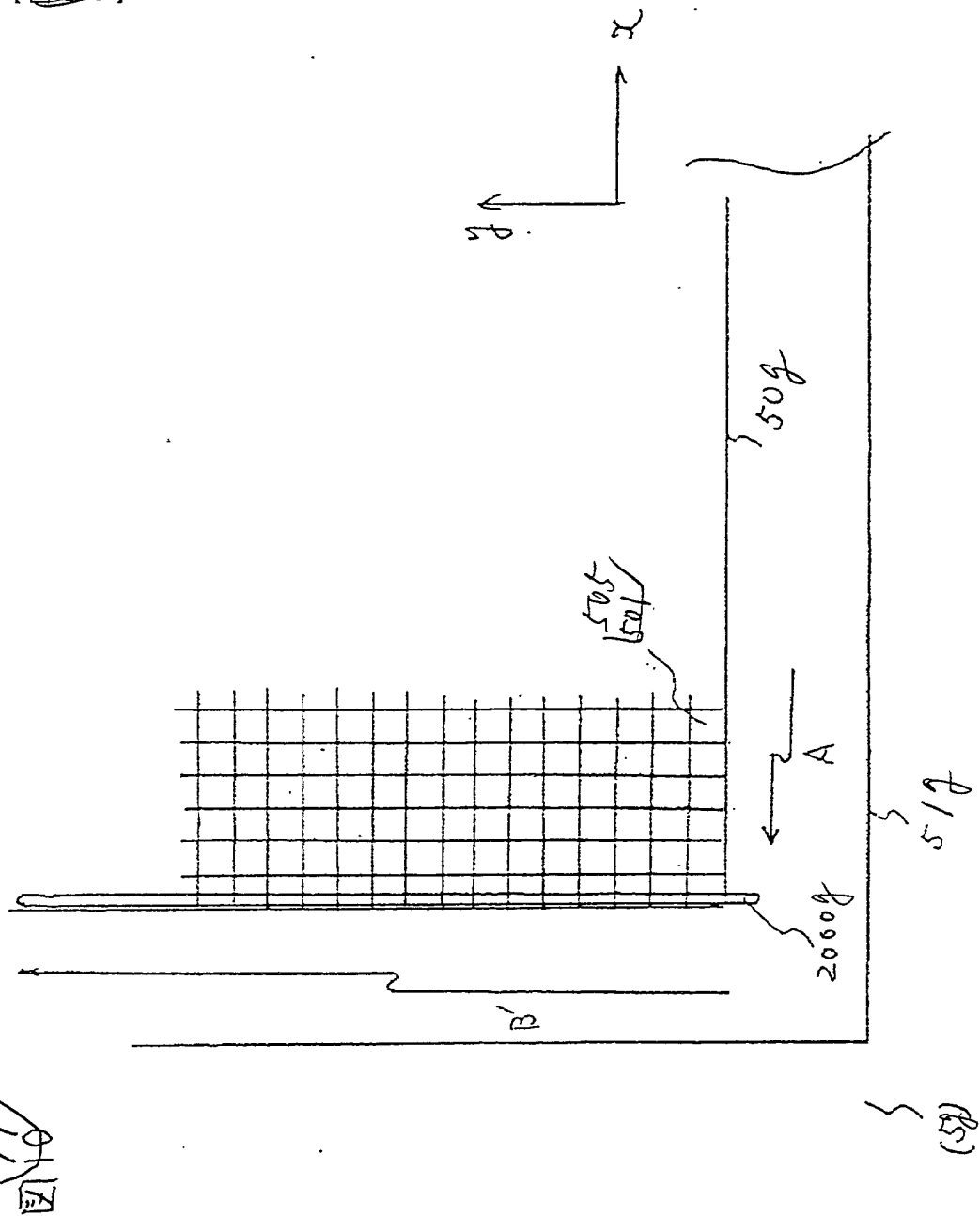
ファイル名 = D00005301A1.e1



05078652.100400

ファイル名 = D00005301A1.el

(~~図10~~)



ファイル名 = D00005301A1.el

【図 1】

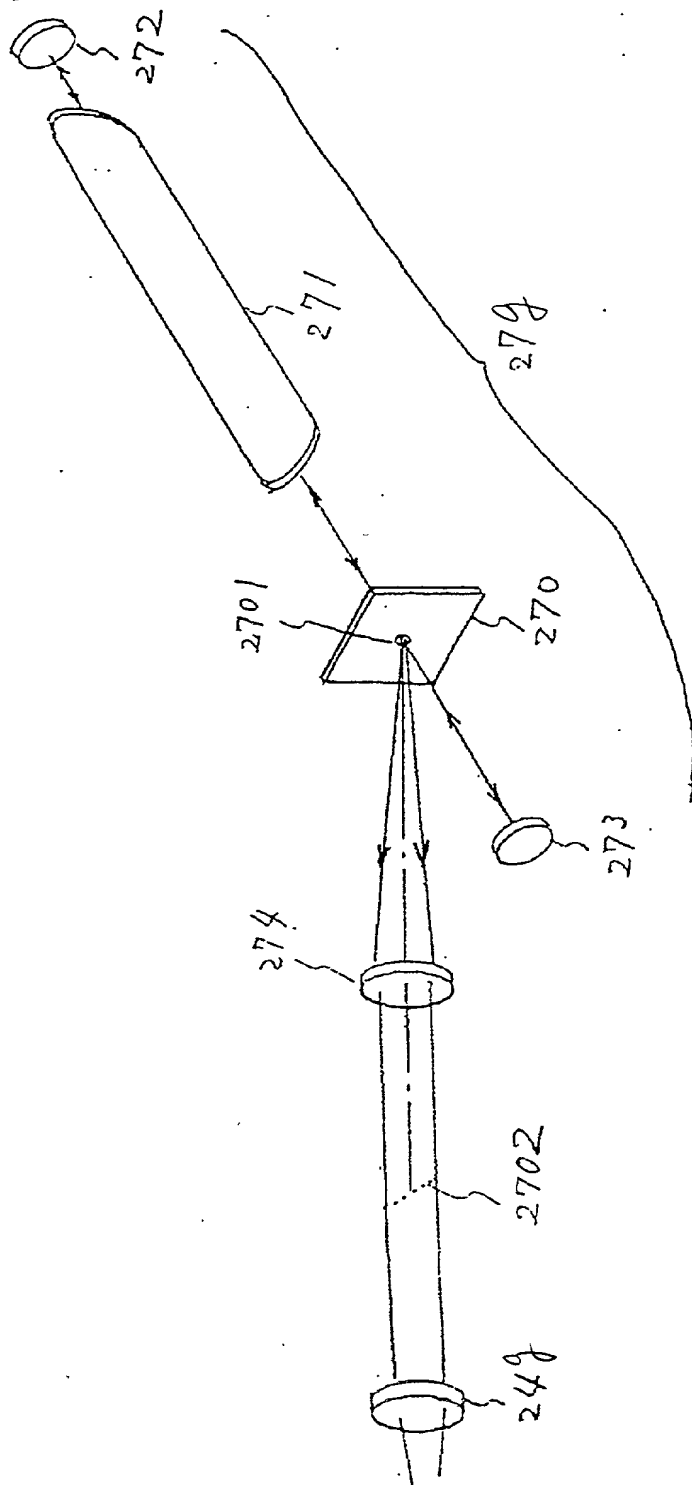


図 1

004001" 2533/359